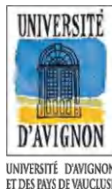




Anses Sophia Antipolis
Unité Pathologie de
l'Abeille



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
École Doctorale 536 Agrosociences et Sciences



INRA PACA
UR 406 Abeilles et
Environnement

THÈSE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
pour obtenir le grade de

Docteur en sciences

Spécialité : Biologie

Soutenance prévue le : 21 décembre 2017

par

Marianne Coulon

Rôle des interactions virus/pesticides dans le déclin des abeilles

Devant le jury composé de :

Dr David Biron	Rapporteur
Dr Elisabeth Herniou	Rapporteur
Pr Frédéric Delbac	Examineur
Dr Suzanne Bastian	Examineur
Dr Yves Le Conte	Directeur de thèse
Dr Richard Thiéry	Directeur de thèse
Dr Anne Dalmon	Co-Encadrant
Dr Eric Dubois	Co-Encadrant
Dr Cédric Alaux	Co-Encadrant
Dr Magali Ribière-Chabert	Co-Encadrant

Table des matières

Remerciements.....	7
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures	11
Introduction générale.....	15
1) L'abeille, insecte social	15
2) Importance des pollinisateurs	17
3) Les affaiblissements et pertes de colonies d'abeilles domestiques	19
4) Les facteurs de stress de l'abeille domestique.....	21
a) Qu'est-ce qu'un facteur de stress ?	21
b) Les différents facteurs de stress	21
5) Les virus	27
a) Généralités	27
b) Les virus de l'abeille.....	28
c) Le virus des ailes déformées, ou DWV	31
d) Le virus de la paralysie chronique, ou CBPV	39
e) Les réponses de l'abeille aux pathogènes	42
6) Les pesticides.....	52
a) Les néonicotinoïdes	53
b) Règlementation	59
c) Dans l'environnement.....	60

d) L'effet des pesticides sur l'immunité des abeilles	65
7) Des interactions ?.....	66
Questions de recherche et objectifs de la thèse.....	75
Chapitre 1 : Etude en laboratoire des effets de la co-exposition d'abeilles émergentes au CBPV et au thiaméthoxam	79
1.Développement d'une méthode de transmission du CBPV par contact... 83	
1) Introduction	83
2) Matériel et méthodes	84
3) Résultats et discussion	85
2.Métabolisation du thiaméthoxam et co-exposition avec le CBPV	89
Article 1: Metabolization of thiamethoxam (a neonicotinoid insecticide) and interaction with the <i>Chronic bee paralysis virus</i> in honeybees	91
Abstract	91
1.Introduction	92
2.Materials and Methods	95
3.Results	101
3.1. Experiment 1: metabolisation kinetics of thiamethoxam	101
3.2. Experiment 2: CBPV-thiamethoxam co-exposure	107
4.Discussion	113
Conflict of interest statement	117
Acknowledgements	117
3.Effets d'une co-exposition sur les charges virales, la transcription de gènes et la métabolisation.....	119

Article 2: Chronic exposure to thiamethoxam can promote *Chronic bee paralysis virus* infections in honeybees..... 121

Abstract 121

1.Introduction 122

2.Materials and Methods 125

3.Results 131

 3.1. Experiment 1: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on bee survival, virus loads and physiology 131

 3.2. Experiment 2: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on pesticide metabolisation 141

4.Discussion 143

Acknowledgements 151

Author contributions 151

Chapitre 2 : Expérimentations in situ sur le DWV et développement d'un clone 153

1.Etudes de co-expositions thiaméthoxam-DWV en ruche 155

Article 3: Interactions between thiamethoxam and *Deformed wing virus* can drastically impair behaviour of free flying honey bees 159

Abstract 159

1.Introduction 160

2.Materials and methods 163

3.Results 171

 3.1. Thiamethoxam influence on viral loads 171

 3.2. Bee survival and onset of foraging 175

3.3. Expression level of immune and detoxication genes.....	181
4.Discussion	181
Aknowledgments.....	185
Supplementary Data	186
2.Development of a clone of the honeybee Deformed wing virus by homologous recombination in yeasts	189
Article 4: Construction of a cDNA clone of <i>Deformed wing virus-A</i> and an A/B recombinant (genus <i>Iflavirus</i>, family <i>Iflaviridae</i>).....	191
1.Introduction	191
2.Materials and Methods	195
3.Results and discussion.....	209
3.1. Obtained DWV clones.....	209
3.2. Infectivity tests: viral quantification.....	211
4. Infectivity tests: sequencing	215
5. Infectivity tests: verification.....	217
Discussion générale.....	219
Annexes 1 – Communications affichées	231
Annexes 2 - Curriculum vitae	235
Bibliographie.....	237

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury Suzanne Bastian et Frédéric Delbac, ainsi qu'Elisabeth Herniou et David Biron d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais ensuite remercier mes directeurs de thèse Richard Thiéry et Yves Le Conte de m'avoir accueillie chacun dans leur laboratoire, et pour leur pédagogie, leur écoute, ainsi que leur relecture attentive de ce manuscrit et des articles le composant.

Je remercie également Cédric Alaux et Magali Ribière-Chabert pour leur encadrement. Merci notamment à Cédric d'avoir passé quelques heures à nous apprendre à coller des codes-barres sur les abeilles ! Ainsi que pour ses corrections minutieuses et ses conseils.

Je suis particulièrement reconnaissante de l'encadrement d'Anne Dalmon et Eric Dubois lors de cette thèse. Je les remercie tous deux de leur grande disponibilité, leur soutien et leur sympathie ainsi que leur grande implication dans le déroulement de cette thèse, que ce soit au niveau du design des expériences ou à la paillasse. Anne, merci d'avoir effectué une grande partie des expériences avec moi, et d'avoir notamment effectué tant d'injections et de marquages sur des journées entières, pour un résultat incertain mais finalement au rendez-vous. Merci également d'avoir comblé nombre de mes lacunes en virologie et Eric, merci pour tes idées de rédaction ou d'organisation, et pour ces discussions toujours éclairantes.

Je remercie également les trois équipes qui m'ont accueillie durant ma thèse, à l'INRA d'Avignon et à l'Anses de Sophia Antipolis, mais également à Naples dans l'équipe de Francesco Pennacchio, et surtout mon encadrant sur place Gennaro Di Prisco, en souhaitant que cette collaboration commencée ici puisse continuer après mon départ.

A l'INRA, je voudrais remercier particulièrement Yannick Poquet pour son aide et ses nombreux conseils. Je voudrais également Didier Crauser pour son aide au marquage et pour les compteurs optiques. Finalement je voudrais remercier Mathilde Peruzzi pour son aide et sa bonne humeur.

A l'Anses, je voudrais tout d'abord remercier Frank Schurr, pour m'avoir appris beaucoup de ce que je sais à présent sur les expériences sur abeilles en cagette, ainsi que la quantification par PCR ; merci également pour ton humour et ton soutien. Je souhaite également remercier l'équipe chimie, Anne-Claire Martel, Patrick Mangoni et Adrien Bégau pour leur travail sur mes échantillons et leur expertise, ainsi que leur gentillesse et leur bonne humeur sans failles. Merci également à Nicolas Cougoule d'avoir été très patient avec moi sur le rucher et de m'avoir montré comment manipuler les abeilles, et inculqué quelques rudiments d'apiculture. Je remercie également toute l'équipe pour leur bonne humeur et soutien sans failles,

notamment Elise Yang et Nicolas Gaiani, qui lorsqu'ils étaient présent étaient toujours là pour me soutenir, et qui même de loin continuent à prendre des nouvelles de mon avancement.

Je remercie tous ceux que je n'ai pas cité dans les deux équipes pour leur présence et leur accueil.

En dehors du travail, il y a les irréductibles, et je voudrais remercier mon amie d'enfance (on peut dire ça maintenant, 17 ans !) Blandine qui, même sans pouvoir se voir sur de longs, très longs moments, a toujours quand c'était possible fait le détour pour venir refaire le monde autour d'une tisane, et pris le temps de m'écouter et de me faire rire. A 17 ans de plus, la vieille.

Je voudrais également remercier Marie, toujours au rendez-vous pour nos conversations nocturnes et son soutien sans faille, dans des moments difficiles, mais aussi dans d'excellents ! Merci de m'avoir écoutée, merci de m'avoir remise sur les rails.

Je remercie aussi toute une bande qui ne lira jamais cette thèse mais qui m'ont soutenu d'aussi loin qu'on puisse imaginer, pour leurs gentils petits mots et pour m'avoir permis de me changer les idées.

Je voudrais bien sûr remercier ma famille, et surtout mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible, pour leur soutien et leur compréhension. C'est à eux que je dois mon envie d'apprendre et ma curiosité, qui m'ont amené à continuer mes études et se sont toujours démenés pour me permettre de suivre mes passions. Et merci leur aide indispensable pour les déménagements et autres papiers administratifs ! Merci de m'avoir permis d'arriver jusqu'ici.

Enfin, je voudrais remercier Benjamin, d'avoir toujours été là, de m'avoir toujours poussée à continuer, même si cela signifiait être loin l'un de l'autre pendant autant de temps, à tenir bon. De m'avoir motivée à donner le meilleur de moi-même, comme il le fait toujours lui-même. De m'avoir supportée (dans tous les sens du terme !) dans les moments difficiles. De m'avoir motivée, aussi, plutôt poussée, à sortir un peu, même pour aller braver la pluie et le vent à la pêche... Merci d'être toujours là, merci d'être toi, je ne sais pas si je te mérite ! Encore un petit effort, et nous allons enfin pouvoir nous retrouver, pour ne plus nous lâcher.

Liste des abréviations

ABPV : <i>Acute bee paralysis virus</i> – virus de la paralysie aigue de l'abeille	colonies d'abeilles, Commission Européenne
ADN : Acide désoxyribonucléique	FAO : Food and Agriculture Organization - Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
ADNc : ADN complémentaire	GSTS : glutathionne-S-transférases
AKI : complexe AKI – complexe comprenant les virus proches génétiquement ABPV, KBV, IAPV	IAPV : <i>Israeli acute paralysis virus</i> – virus israélien de la paralysie aigue
AMP : peptide anti microbien	ICTV : International committee on viruses – Comité international de taxonomie des virus
Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail	Imd : Immune deficiency pathway – voie de déficience de l'immunité
ARN : Acide ribonucléique	INRA : Institut National de Recherche Agronomique
ARNdb : ARN double brin	Jak/STAT : Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription
ARNsb : ARN simple brin	JNK : c-Jun N-terminales Kinases
ATP : adénosine tri-phosphate	KBV : <i>Kashmir bee paralysis virus</i> – virus de la paralysie du Cachemire
BQCV : <i>Black queen cell virus</i> – virus des cellules de reines noires	LRR : Leucine rich repeat – protéine à répétition riche en leucine, facteur de transcription
Bt : toxine produite par la bactérie <i>Bacillus thuringiensis</i>	NFκB : Nuclear factor Kb – facteur nucléaire κB
CBPV : <i>Chronic bee paralysis virus</i> – virus de la paralysie chronique	ORF : Open reading frame – cadre de lecture ouvert
CCD : Colony Collapse Disorder – syndrome d'effondrement des colonies	pb : paires de base
CCE : carboxylestérases	Poly (A) : poly adénylé
CMV : cytomégalovirus	PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaine par polymérase)
COLOSS : honey bee research association, prevention of honey bee COLony LOSSes – association de recherche sur l'abeille, prévention des pertes de colonies	qPCR : réaction en chaine par polymérase quantitative
CYP450 : cytochrome P450	RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane, insecticide organochloré	RFID : Radio-frequency identification – radio-identification
DL50 : dose létale 50%	RNAi : ARN interférence
DWV : <i>Deformed wing virus</i> – virus des ailes déformées	
EPILOBEE : programme de surveillance active de la mortalité des	

ROS : reactive oxygen species – espèce réactive de l'oxygène

RT : rétro transcription

SBV : *Sacbrood virus* – virus du couvain sacciforme

siRNA : small interfering RNA - petits ARN interférents

UTR : Untranslated region – région non transcrite

VDV-1 : *Varroa destructor virus 1* – virus du *Varroa destructor* 1, à présent nommé DWV-B

VP-1, 2, 3 : viral protein – protéine virale

Liste des figures

Ne sont listées que les figures appartenant au manuscrit, les figures pour chaque article scientifique possèdent leur propre numérotation.

- Figure 1** : Les différents individus peuplant la colonie, d'après Winston, 1987.
Page 18
- Figure 2** : Le polyéthisme d'âge chez *Apis mellifera* d'après Winston, 1987.
Page 20
- Figure 3** : Taux de mortalité en sortie d'hivernage et saison apicole en Europe (EPILOBEE, (Laurent et al., 2015)).
Page 22
- Figure 4** : Quelques un des parasites et pathogènes qui infectent l'abeille domestique.
Page 28
- Figure 5** : Les facteurs de stress s'appliquant à l'abeille domestique.
Page 30
- Figure 6**: Tableau de hiérarchisation des dangers les plus importants pour la santé des abeilles et l'apiculture (ANSES, 2012).
Page 34
- Figure 7** : Quelques signes cliniques liés au DWV.
Page 36
- Figure 8** : La structure moléculaire de la capsid du DWV (d'après Škubník et al., 2017).
Page 38
- Figure 9** : La structure du génome du DWV (d'après Dalmon et al., 2017b).
Page 38
- Figure 10** : Quelques signes cliniques liés au CBPV.
Page 42
- Figure 11** : Structure et génome du CBPV.
Page 44
- Figure 12** : L'immunité antivirale chez *Apis mellifera* (tiré de Brutscher et al., 2015).
Page 50

Figure 13 : Variation de la tolérance de différents tissus et/ou processus physiologiques soumis à différentes charges pathogènes (tiré de Medzhitov et al., 2012).

Page 54

Figure 14: Structure chimique du thiaméthoxam.

Page 58

Figure 15 : Structure chimique de la clothianidine.

Page 62

Figure 16 : Métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine.

Page 62

Figure 17 : Les différentes phases de détoxification des xénobiotiques chez l'abeille domestique (d'après Berenbaum and Johnson 2015).

Page 66

Figure 18 : Résumé des effets observés des interactions virus-pesticides déjà observées chez l'abeille domestique (d'après Alburaki et al., 2015; Degrandi-hoffman et al., 2013; Doublet et al., 2015; B Locke et al., 2012).

Page 72

Figure 19 : Modulation de la réponse des abeilles à une infection au DWV par la clothianidine (d'après Di Prisco et al., 2013)

Page 74

Figure 20 : Résumé des effets de chaque protagoniste sur l'abeille domestique et question : que se passe-t-il quand l'abeille est confrontée aux deux simultanément ?

Page 76

Figure 21 : Le rucher hivernal utilisé pour fournir les abeilles d'une partie des expérimentations effectuées au laboratoire de l'Anses de Sophia-Antipolis (expériences effectuées de Janvier à Mars).

Page 84

Figure 22 : Schéma récapitulatif de la méthode de transmission du CBPV par contact entre abeilles infectées et abeilles saines développée et utilisée dans ce chapitre.

Page 86

Figure 23 : Représentation graphique des charges virales (\log_{10} équivalent de copies génome viral par abeille) en fonction des modalités d'exposition des abeilles au CBPV.

Page 90

Figure 24 : Vérification des charges après lavage à la RNase.

Page 90

Figure 25 : Schéma récapitulant la méthode utilisée pour tester une co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam en exposition chronique et conditions contrôlées.

Page 92

Figure 26: Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de suivre la cinétique de dégradation du thiaméthoxam en clothianidine, lors d'une exposition chronique et en conditions contrôlées.

Page 94

Figure 27 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de suivre la cinétique de dégradation du thiaméthoxam en clothianidine lors d'une co-exposition avec le CBPV et en conditions contrôlées.

Page 122

Figure 28 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de tester l'effet d'une exposition aigue au thiaméthoxam sur des abeilles provenant de colonies infectées selon un gradient de la plus faible charge en DWV à la plus élevée.

Page 158

Figure 29 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de tester l'effet de différentes co-expositions entre le DWV et le thiaméthoxam avec des compteurs optiques.

Page 160

Figure 30 : Dilution des quantités en pesticides dans les colonies d'*Apis mellifera* (Degrandhoffman et al., 2013).

Page 228

Figure 31 : Détection et infection par les virus de l'abeille domestique dans des abeilles sauvages et autres pollinisateurs proches testés.

Page 230

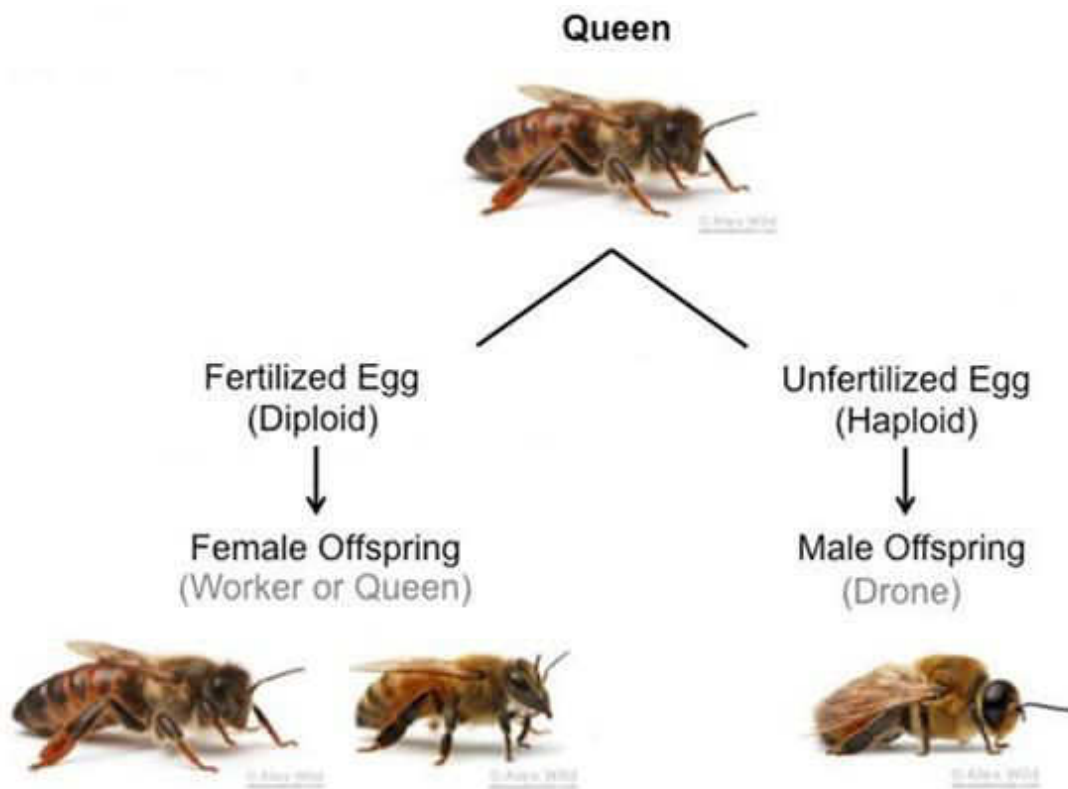


Figure 1 : Les différents individus peuplant la colonie.

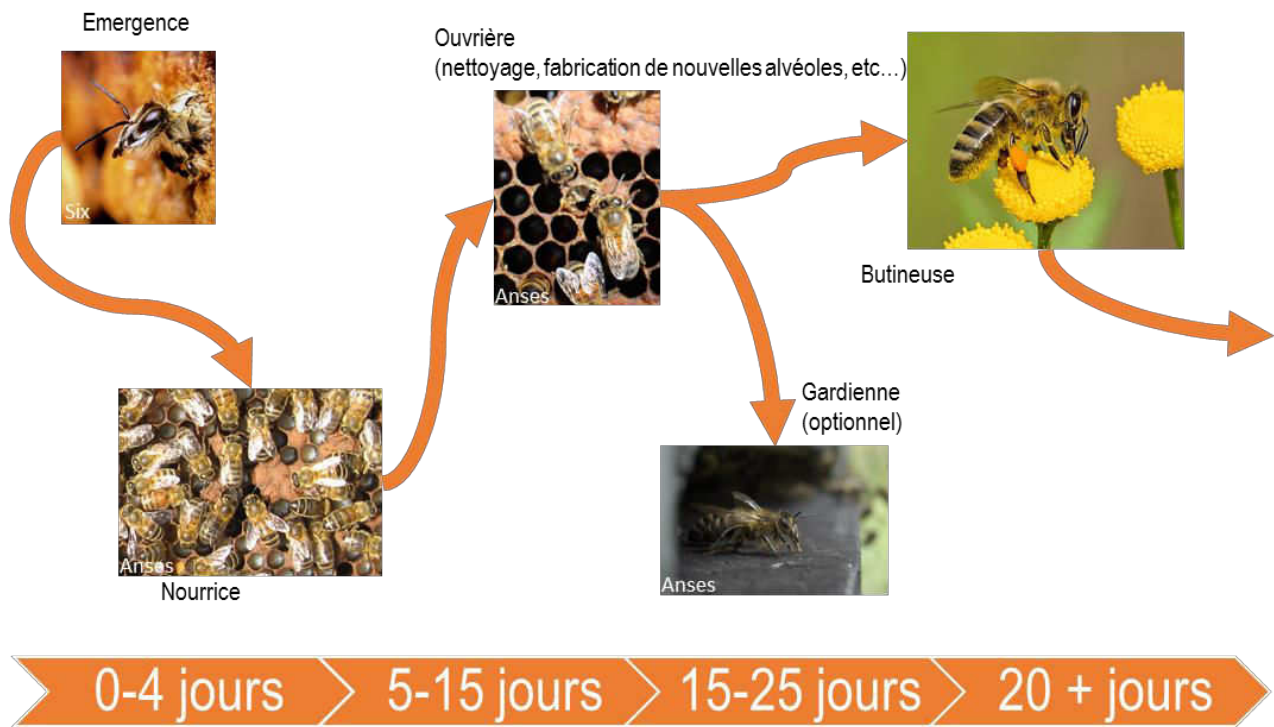
Introduction générale

1) L'abeille, insecte social

L'abeille domestique, *Apis mellifera* L., est un insecte eusocial de l'ordre des Hyménoptères, vivant en groupes structurés en castes. L'espèce est organisée en colonies de plusieurs milliers d'individus (entre 10 000 et 50 000) (Winston, 1987) autour d'une seule reine (seule femelle fécondée de la colonie, capable d'une reproduction sexuée). La reine, lorsqu'elle pond des œufs fécondés, produit des femelles qui se différencieront en ouvrières ou en d'autres reines selon le régime alimentaire qui sera apporté aux larves. La reine peut également pondre des œufs non fécondés, qui par parthénogénèse donneront des mâles, ou faux-bourçons (figure 1). Toutefois et en cas de perte de la reine, les ouvrières sont également capables de produire des faux-bourçons par parthénogénèse, mais cette issue est sans avenir pour la colonie (alors dite bourdonneuse) qui périra (Winston, 1987). Pendant le stade larvaire, la future reine est élevée par les ouvrières qui la nourrissent uniquement de gelée royale jusqu'à operculation de l'alvéole, à l'inverse les futures ouvrières ne sont supplémentées en gelée royale que les 3 premiers jours puis reçoivent ensuite du pollen et du nectar ou du miel.

Au sein de la colonie, les ouvrières sont organisées selon un polyéthisme d'âge : une division du travail en fonction de leur âge (figure 2). Les ouvrières les plus jeunes nettoient les alvéoles précédemment occupées par leurs consœurs (3-4 premiers jours), puis elles deviennent nourrices des larves et de la reine (5-10 jours), productrices de cire pour operculer les alvéoles, responsables de l'hygiène et/ou puis gardienne (11-22 jours) et enfin deviennent pour certaines gardiennes (10-15%) gardiennes et ensuite, ou directement, butineuses jusqu'à leur mort, qui survient environ 25 à 30 jours après l'émergence pour les abeilles nées entre avril et septembre (Winston, 1987).

Les abeilles « d'hiver », nées des dernières pontes en septembre - octobre, possèdent une physiologie différente qui leur permet de survivre tout l'hiver pour maintenir la ruche à une température permettant la survie de la reine, pour la nourrir, puis afin de s'occuper du nouveau couvain au retour des beaux jours (Winston, 1987).



D'après Clément, 2011 ; photographies libres de droits , sauf précisé

Figure 2 : Le polyéthisme d'âge chez *Apis mellifera*

2) Importance des pollinisateurs

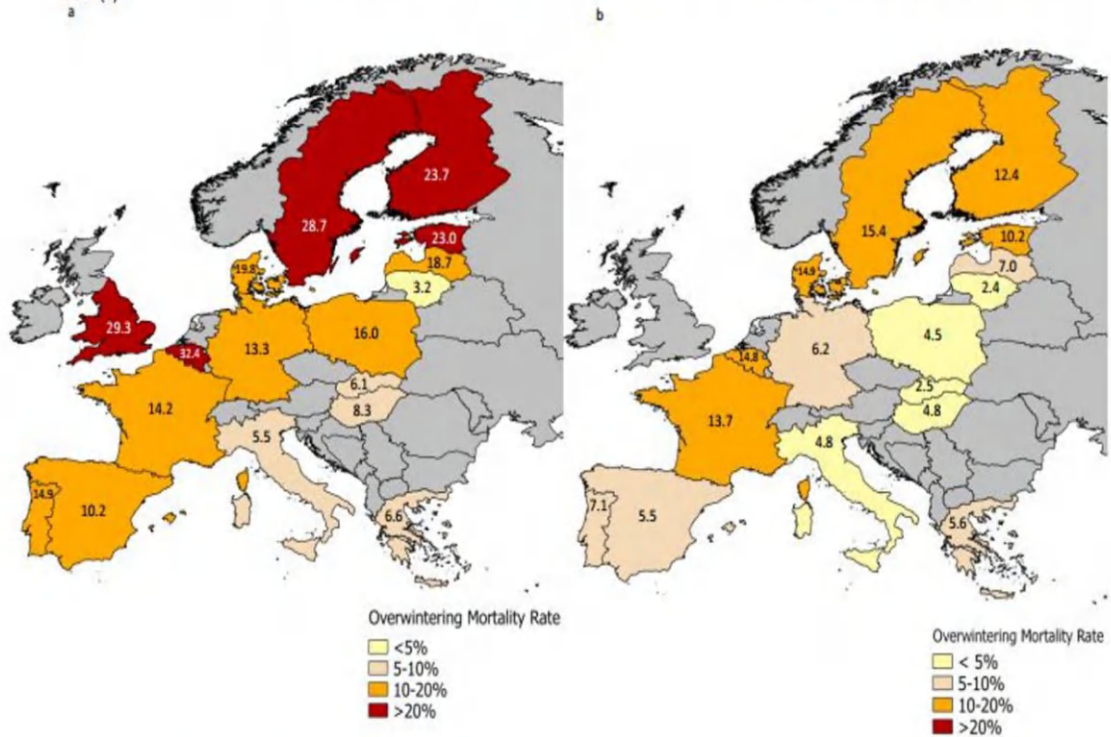
En qualité d'insecte pollinisateur domestique, *A. mellifera* a pris une place considérable dans l'agriculture mondiale, au point que le seul continent où elle n'a pas été importée est l'Antarctique (Winston, 1987). Elle est utilisée par l'homme non seulement pour produire de la cire ou du miel depuis le Néolithique (Roffet-Salque et al., 2015), mais aussi pour sa grande capacité de pollinisation de diverses plantes à fleurs (sous-ordre : *Angiospermes*) (Aston and Bucknall, 2009) comme pollinisatrice de cultures. La demande en services de pollinisation pour l'agriculture est en augmentation constante (Aizen and Harder, 2009). Notamment aux Etats-Unis, une partie des apiculteurs n'utilise plus les abeilles pour produire du miel mais surtout pour le service de pollinisation qu'elles offrent, transhumant leurs ruches d'une région de monoculture à une autre, et ce à travers tout le continent Nord-Américain (Morse and Calderone, 2000).

La pollinisation des plantes entomophiles par les insectes est reconnue comme cruciale (Gallai et al., 2009), et est donc récemment devenue un sujet d'étude important visant à évaluer l'apport de ces derniers à la production de fruits, légumes, noix et enfin graines pour la propagation ou la création de cultures et le maintien de variétés florales. On peut citer Williams, 1994, qui estimait que 84% des 264 cultures les plus importantes en Europe dépendent au moins jusqu'à un certain point de la pollinisation animale (presque exclusivement des insectes) pour leurs productions. Klein et al., 2007 ont calculé à partir de données de 200 pays que les pollinisateurs étaient absolument essentiels pour 13 des 107 plus importantes cultures mondiales en fonction de leur type. En outre, 30 autres de ces cultures étaient très dépendantes des pollinisateurs, 27 modérément dépendantes, 21 légèrement dépendantes, 7 peu dépendantes, et enfin de dépendance aux pollinisateur inconnue pour 9 d'entre elles. En effet, certaines des cultures les plus répandues n'ont effectivement aucun besoin de pollinisation animale, pouvant être reproduites de façon végétative ou être anémogames (se dit de plantes dont la pollinisation s'effectue par le vent, par exemple les céréales, riz et maïs).

Cependant, la fraction de cultures dépendantes de la pollinisation dans l'agriculture augmente beaucoup plus rapidement que n'augmente le nombre de colonies domestiques (45% d'augmentation de la population d'abeilles domestiques contre 300% d'augmentation

Overwintering colony mortality (winter 2012 – 2013 and winter 2013 – 2014)

Figure 1: Winter colony mortality rates in the Member States of the European Union recorded in EPILOBEE 2012 – 2013 (Revised map) (a) and EPILOBEE 2013 – 2014 (b)



Seasonal colony mortality (spring – summer 2013 and spring – summer 2014)

Figure 2: Seasonal colony mortality rates in the Member States of the European Union recorded in EPILOBEE 2012 – 2013 (Revised map) (a) and EPILOBEE 2013 – 2014 (b)

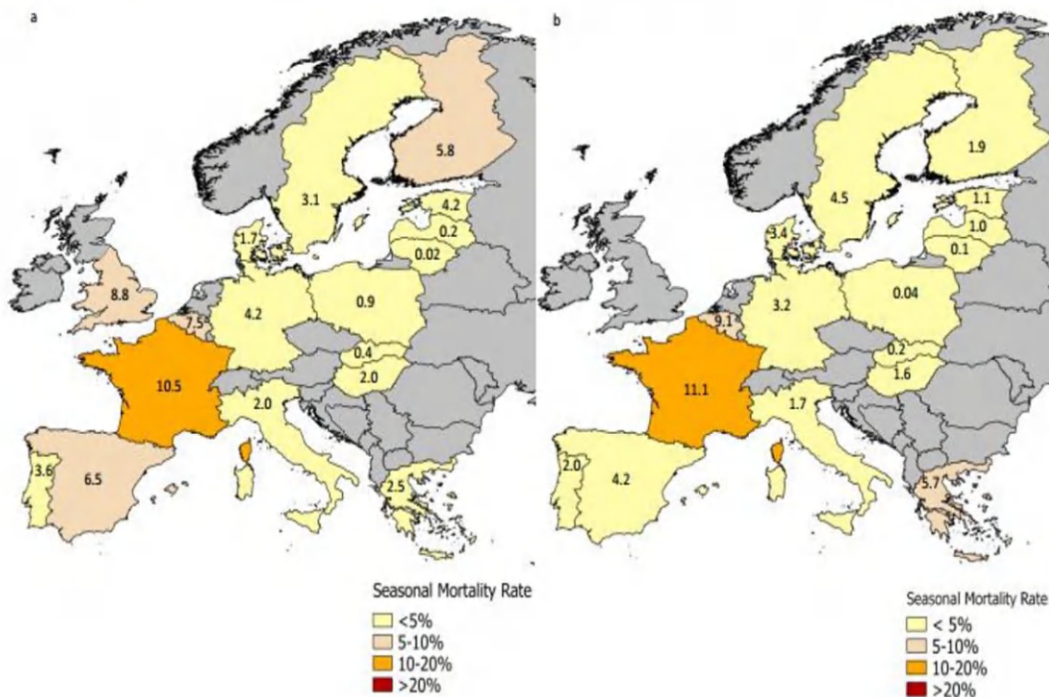


Figure 3 : Taux de mortalité en sortie d'hivernage et saison apicole en Europe (EPILOBEE (Laurent et al., 2015))

de la fraction de cultures dépendantes de la pollinisation dans les 50 dernières années (Aizen and Harder, 2009; Breeze et al., 2014)).

L'abeille domestique, *Apis mellifera*, n'est pas forcément le meilleur pollinisateur pour toutes les cultures, et n'est pas non plus le seul insecte indispensable à une pollinisation efficace (Garibaldi et al., 2016); cependant dans un contexte de déclin sévères des insectes pollinisateurs sauvages (Goulson et al., 2015), l'abeille domestique, avec sa répartition globale et sa domesticité, pourrait devenir encore plus précieuse par sa capacité de pollinisateur généraliste et son potentiel de remplacement d'autres espèces locales en diminution. Cependant, il a été démontré qu'une plus grande richesse en diversité des pollinisateurs permettait d'améliorer le rendement des cultures de petites exploitations ; pour les grandes cultures, une richesse très élevée est indispensable à un bon rendement (Garibaldi et al., 2016).

3) Les affaiblissements et pertes de colonies d'abeilles domestiques

Comme un certain nombre d'autres organismes, les pollinisateurs subissent, depuis le dernier demi-siècle notamment, un fort déclin caractérisé par une réduction à la fois de leur répartition et de leur nombre inter et intra-espèce (Goulson et al., 2015).

Une très grande partie des cultures exploitées par l'homme pour se nourrir dépend donc de la pollinisation par les insectes. Smith et al., 2015 ont modélisé l'impact d'une perte totale des pollinisateurs (abeille domestique comprise) à l'échelle mondiale sur la nutrition humaine, et conclu que les réserves globales en fruits seraient diminuées de 22,9%, en légumes de 16,3% et en graines et fruits à coques de 22,1% ; entraînant de façon directe la mort de 1,42 million de personnes par an, sans compter les morts indirectes dues à l'aggravation de conditions préexistantes. Ce scénario, très alarmiste, devait surtout servir à souligner l'importance de la pollinisation animale dans le monde et pour l'alimentation humaine en général.

L'abeille domestique elle-même subit de fortes pertes. Ces pertes sont toutefois plus faciles à déterminer, en termes de colonies, grâce à leur importance socio-économique, et à une plus grande facilité de suivi dans le temps, puisque ces colonies sont relativement

pérennes. Des suivis dans le temps ont été effectués par un grand nombre de pays (Laurent et al., 2015a; Lee et al., 2015). Cependant, cette importance socio-économique peut entraîner

des biais dans l'évaluation du nombre de colonies au cours du temps. En effet, le nombre de colonies est en général fortement lié au nombre d'apiculteurs. En Europe et aux Etats-Unis, où de forts déclin en nombre de colonies ont été enregistrés (baisse de 16% du nombre de colonies entre 1985 et 2005), il a été rapporté un déclin concomitant du nombre d'apiculteurs (baisse de 31% du nombre d'apiculteurs entre 1985 et 2005 (S. G. Potts et al., 2010b). Les apiculteurs peuvent néanmoins eux même compenser les pertes en augmentant leur nombre de colonies. Il faut également noter que le nombre de colonies d'*Apis mellifera* dans le monde est en augmentation, avec une augmentation de 45% dans le monde entre 1960 et 2010 ; mais une diminution de 25% en Europe et de 57% aux Etats-Unis (VanEngelsdorp and Meixner, 2010).

Nonobstant ces causes socio-économiques, un phénomène de fortes mortalités d'abeilles et de pertes de colonies existe bel et bien. En Europe sur l'hiver 2012-2013, il a été rapporté de forts pourcentages (jusqu'à 29,3% au Royaume Uni par exemple) de pertes de colonies par les apiculteurs en sortie d'hivernage (Laurent et al., 2015), supérieurs aux taux naturels attendus de 10 à 15%, mais également en 2013-2014 des pertes élevées en saison (10,5% en France) (Laurent et al., 2015) (figure 3). Il est d'autant plus important d'étudier ces pertes puisque les autres pollinisateurs sont en déclin -et que peu de colonies d'*Apis mellifera* sauvages ou « férales » subsistent encore dans la nature (Goulson et al., 2015; S. Potts et al., 2010; S. G. Potts et al., 2010a).

Un phénomène de disparition des abeilles de leur ruche a été décrit en 2007 aux Etats-Unis (Oldroyd, 2007), puis rapporté également par des apiculteurs Européens (Dainat et al., 2012c). Décrit sous les termes de Colony Collapse Disorder (CCD), il se caractérise principalement par un nombre extrêmement réduit d'ouvrières adultes dans la ruche, malgré la présence de la reine, des réserves de nourriture et du couvain. N'ayant plus une population suffisante pour subvenir à ses propres besoins, la ruche finira par mourir ou sera éliminée par l'apiculteur.

Lors de l'hiver 2007, des pertes atteignant de 50 à 90% des colonies de différents ruchers ont été enregistrées (Cox-foster et al., 2007), voire jusqu'à 100% des colonies pour certains

(Oldroyd, 2007). De telles disparitions avaient déjà été observées dans l'histoire (i.e. en 950 puis en 1443 en Irlande, en 1903 ou en 1995 aux USA) mais sans être aussi extrêmes que la disparition totale de colonies observées début 2007 (Oldroyd, 2007). Des pertes de colonies correspondant aux syndromes de CCD sont régulièrement observées depuis cette date.

Le CCD, ainsi que les fortes pertes hivernales ou en saison observées en Europe, ne peuvent être expliquées par une seule cause spécifique, et serait le résultat d'un stress multifactoriel agissant sur les colonies (Goulson et al., 2015; Oldroyd, 2007; S. G. Potts et al., 2010a).

4) Les facteurs de stress de l'abeille domestique

a) Qu'est-ce qu'un facteur de stress ?

Tout organisme fait partie d'un environnement, dont il dépend et avec lequel il interagit. La définition biologique d'un stress est l'ensemble des réponses d'un organisme à une ou des pressions de son environnement (Romero, 2004). Par extension, la contrainte elle-même peut être qualifiée de stress. L'abeille domestique peut subir simultanément ou successivement plusieurs stress, qui peuvent être communs à tous les pollinisateurs ou spécifiques à *A. mellifera*, en tant qu'insecte social ou en rapport avec sa condition d'animal domestique.

L'environnement peut exercer sur les organismes différentes pressions, biotiques, par la présence de pathogènes et/ou de parasites par exemple, ou abiotiques, comme la température ambiante. Dans un contexte d'environnement changeant et impacté par l'action directe ou indirecte de l'homme (par exemple le réchauffement climatique, l'urbanisation, les pratiques agricoles), les stress causés par l'environnement peuvent s'accroître et se multiplier.

b) Les différents facteurs de stress

Plusieurs études concordent pour définir les stress qui accablent les pollinisateurs en général et l'abeille domestique en particulier (Goulson et al., 2015 ; Potts et al., 2010a)(récapitulés dans la figure 5 en fin de ce paragraphe) :

- La perte d'habitats
- Le réchauffement climatique
- La faible diversité des ressources en nourriture
- Les pratiques agricoles, les pesticides
- Les parasites et pathogènes
- Les pratiques apicoles

La perte d'habitats (principalement pour les pollinisateurs sauvages) est causée principalement par l'action de l'homme, avec l'urbanisation et l'agriculture intensive qui réduisent la disponibilité en lieux de nidification et les espaces de butinage (Goulson et al., 2015; S. G. Potts et al., 2010a). La perte d'habitats est également liée au réchauffement climatique, qui est défini comme un stress en soi, puisque le réchauffement peut influencer sur la distribution spatiale des espèces de plantes (Bertin et al., 2008). Par exemple, certaines plantes parmi les moins adaptées à la chaleur ont disparu du pourtour Méditerranéen français au cours des 150 dernières années (Lavergne et al., 2006).

Le réchauffement climatique peut déjà être considéré comme étant un stress lui-même, mais il a d'autres effets. Ainsi, il pourrait à plus ou moins long terme causer un décalage dans la phénologie (cycles de vie) entre les pollinisateurs et les plantes dont ils sont dépendants, diminuant encore les chances de nidifications pour certaines espèces, mais également les ressources, et ce pour tous les pollinisateurs (Fitter, 2002; Goulson et al., 2015; Rasmont et al., 2015). Par exemple il a été observé en Espagne une émergence plus précoce des abeilles domestiques, sous l'action des températures plus douces, que le début de floraison de certaines fleurs qu'elles visitent au printemps (Gordo and Sanz, 2006). Le décalage pourrait également être spatial, avec des espèces de plantes dont le préférendum climatique se déplacerait différemment de celui des pollinisateurs (Bertin et al., 2008), diminuant les ressources florales à la base de l'alimentation des abeilles domestiques et sauvages. Enfin, le réchauffement climatique serait la cause d'événement climatiques et météorologiques exceptionnels de plus en plus fréquents, tels que tempêtes, crues, et sécheresses, qui ont un impact direct sur les colonies ou sur leurs ressources en nourriture (Goulson et al., 2015).

La faible disponibilité en ressources florales est accentuée par les monocultures intensives et l'utilisation d'herbicides (pratiques agricoles). Pour *A. mellifera*, un régime peu

varié peut entraîner des problèmes de malnutrition (Huang, 2012). En effet, les abeilles ont besoin d'un apport en pollen de sources variées afin d'avoir accès à tous les nutriments qui leurs sont indispensables. Un manque de disponibilité des ressources peut être observé dans l'espace, avec un manque de plantes mellifères ou produisant du pollen à proximité des ruches, ou dans le temps, après par exemple la fin de floraison des monocultures intensives auxquelles sont exposées les abeilles (par exemple : colza et tournesol). La malnutrition a été observée comme pouvant influencer le système immunitaire. Ainsi, une alimentation plus riche en pollen (Huang, 2012) ou diversifiée (Alaux et al., 2010b) entraînera une résistance accrue des abeilles aux pathogènes (Di Pasquale et al., 2013; Huang, 2012; Wilson-Rich et al., 2008).

Les pratiques apicoles peuvent entraîner un stress directement causé par l'apiculteur sur les colonies. Une pratique très répandue est la transhumance des ruches. Elle consiste à déplacer les ruches pour leur fournir un environnement adapté (ressources florales en abondance), et/ou réaliser un service de pollinisation. Aux Etats-Unis, ces transhumances sont pratiquées de manière intensive puisque les apiculteurs américains déplacent leur ruches d'un bout à l'autre du continent, pour proposer leurs services de pollinisation à diverses cultures intensives, notamment les amandiers de Californie (Morse and Calderone, 2000; Oldroyd, 2007). S'ajoute donc au stress du confinement dû au transport un stress nutritionnel potentiel dû aux monocultures exclusives, et un risque d'exposition aux pesticides utilisés sur ces cultures intensives (Goulson et al., 2015 ; Oldroyd, 2007). Outre la transhumance, les échanges d'essaims ou de reines entre les pays, à l'échelle mondiale, peuvent provoquer encore une fois un stress lié au transport, mais surtout propager des pathogènes et des parasites, avec pour conséquence l'émergence de nouvelles maladies. Le cas le plus notable est le transfert entre hôtes d'espèces différentes effectué par l'acarien *Varroa destructor*, entre son hôte d'origine, *Apis cerana*, l'abeille asiatique (également domestique), et *Apis mellifera*, l'abeille européenne, à la fin des années 1960 (Mondet and Le Conte, 2015; Rosenkranz et al., 2010). Aujourd'hui ce parasite a conquis presque tous les ruchers du globe, à l'exception de quelques espaces isolés (îles, et l'Australie (Forsgren et al., 2012; Martin et al., 2012; Mondet et al., 2014). Finalement, les échanges ont également comme conséquence de déplacer les abeilles d'une même espèce d'un écosystème à un autre, pouvant être extrêmement différents, dans un temps très court. Les sous espèces d'*A. mellifera* ont chacune leur spécificité, et leur propre préférendum écologique ; déplacer une espèce dans un milieu auquel elle n'est pas adaptée peut la rendre plus sensible aux conditions climatiques, aux pathogènes, etc...

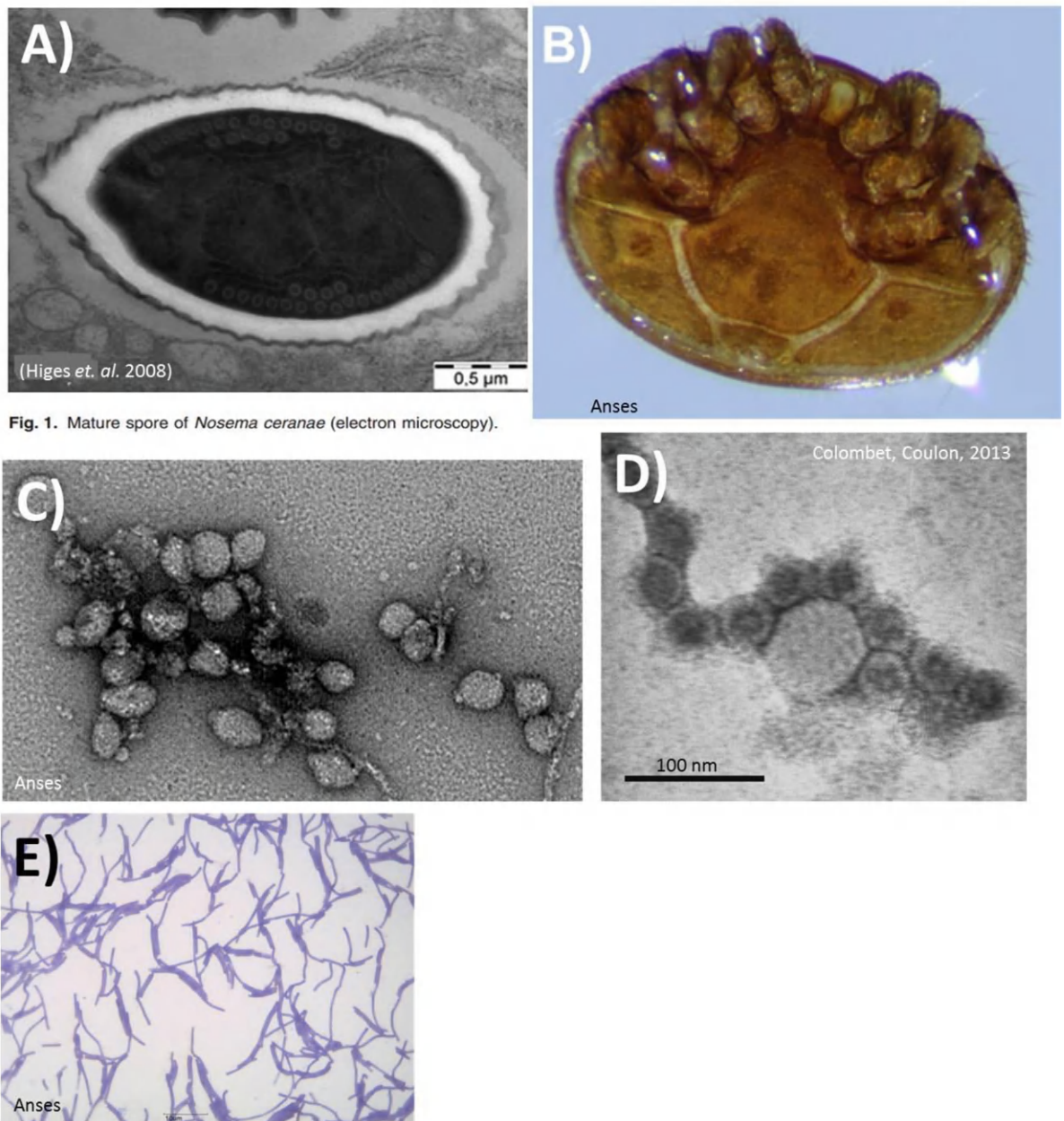


Fig. 1. Mature spore of *Nosema ceranae* (electron microscopy).

Figure 4 : Quelques un des parasites et pathogènes qui infectent l'abeille domestique.

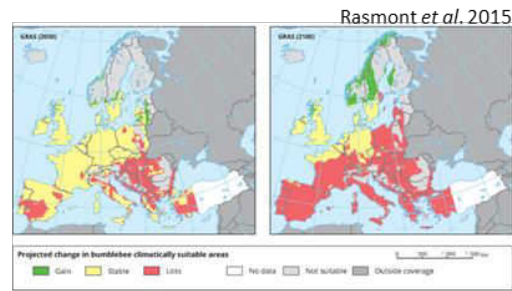
A) *Nosema ceranae*, microscope électronique (Higes et al., 2008b), B) *Varroa destructor*, microscope optique, vue ventrale (Anses) ; C) CBPV observé au microscope électronique (Anses), D) petits virus de 30 nm de forme icosaédrique, structure des virus de l'ordre des *Picornavirales* (Jonathan Colombet & Marianne Coulon, photographie prise en 2013) , E) *Paenibacillus larvae*, bactérie responsable de la loque américaine (maladie du couvain) (Anses)

(Garnery et al., 1998). L'introduction de nouvelles espèces d'abeilles domestiques peut également conduire à l'hybridation des espèces introduites avec les abeilles endémiques à un environnement et à la diminution voire la perte de certaines caractéristiques intéressantes pour les apiculteurs. C'est le cas des abeilles africanisées, hybrides d'*Apis mellifera mellifera* et *Apis mellifera scutellata*, introduite accidentellement en Amérique du Sud : les abeilles africanisées sont plus agressives, moins efficaces pour la pollinisation et produisent moins de miel (Rinderer et al., 1991; Scott Schneider et al., 2004).

Une autre cause a été mise en évidence par une étude à l'échelle européenne (EPILOBEE) : en Europe, les petits ruchers des apiculteurs amateurs présentent des mortalités deux fois plus fortes que ceux des apiculteurs professionnels (Jacques et al., 2017). Ceci serait dû à un manque de formation et à des pratiques mal adaptées, par exemple une capacité limitée des amateurs à reconnaître les signes cliniques des maladies suffisamment en amont et à les traiter ou à engager des mesures de prophylaxie dans le cas de maladies pour lesquelles il n'existe pas de traitement (virus, etc). Ces problèmes seraient statistiquement un des facteurs les plus importants dans les mortalités hivernales en Europe (Jacques et al., 2017).

Enfin, un des deux facteurs majeurs de stress, le plus régulièrement incriminé dans les affaiblissements et pertes de colonies, qu'elles soient domestiques ou sauvages, est l'utilisation de pesticides par l'homme. Les pesticides, qui regroupent principalement des herbicides, fongicides et insecticides, ont déjà été démontrés comme étant nocifs pour les abeilles, que ce soit en provoquant des mortalités massives ou des effets sublétaux, c'est-à-dire ne provoquant pas la mort de l'individu mais des effets comportementaux, de sensibilisation accrue à d'autres stress, des problèmes d'apprentissages et de développement des colonies. Ces effets seront développés dans le paragraphe n°6.

Le deuxième facteur de stress le plus souvent cité regroupe les pathogènes et parasites (figure 4). Chez l'abeille domestique, il existe un grand nombre de pathogènes et/ou de parasites différents, allant d'acariens parasites (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*), en passant par les bactéries (loques : *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*), les champignons (*Ascophaera apis*) et plus précisément des microsporidies (*Nosema apis* et *ceranae*), et enfin les virus (*Deformed wing virus*, *Israeli acute paralysis virus*). Le parasite



Réchauffement climatique

Monocultures, perte de diversité



Facteurs abiotiques et anthropiques

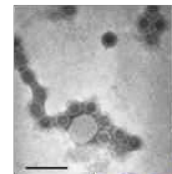
Pesticides



Pratiques apicoles



Virus, bactéries



Facteurs biotiques



Parasites/pathogènes

Varroa destructor, *Nosema* sp.

D'après Potts *et al.*, 2010 et Goulson *et al.*, 2015, European Environment Agency, Rasmont *et al.* 2015

Figure 5 : Les facteurs de stress s'appliquant à l'abeille domestique

intestinal *Nosema ceranae*, tout comme *Varroa*, a commencé à infecter *Apis mellifera* à cause d'un transfert d'hôte, son hôte original étant encore une fois l'abeille asiatique *Apis cerana*. *N. ceranae* est connue comme pouvant réduire de manière très significative la longévité des abeilles (Higes et al., 2008a), affecter leur immunité (Antúnez et al., 2009; Chaimanee et al., 2012; Dussaubat et al., 2012), impacter leur butinage (Alaux et al., 2014), ainsi que causer des stress énergétiques (Mayack and Naug, 2009). *N. ceranae*, notamment, a été reliée à des pertes de colonies (Higes et al., 2009, 2008a), comme l'a également été *Varroa destructor* (Dainat et al., 2012a, 2012c). Les virus et leurs effets seront également décrits plus en détail paragraphe n°5.

5) Les virus

a) Généralités

Parmi tous les pathogènes qui infectent l'abeille domestique, les virus sont de plus en plus étudiés. Les virus ont longtemps été considérés comme n'étant pas des organismes vivants (Forterre, 2010; Knipe and Howley, 2006; Villarreal, 2004). En effet, ils ne possèdent pas de noyau, ne sont pas capables de se reproduire par eux-mêmes, et les plus élémentaires ne sont constitués que d'un acide nucléique et d'une capsidie protéique. Ils sont cependant capables de se multiplier en infectant les cellules d'un hôte et en utilisant la machinerie de transcription et traduction de ces cellules. Ils évoluent au cours du temps, parfois extrêmement vite comparé à d'autres organismes, grâce à leurs petits génomes et à la caractéristique de leurs polymérase qui les rend plus susceptible de faire des erreurs lors de la réplication du génome – notamment chez les virus à ARN (Guyader and Giblot-Ducray, 2004); cette même caractéristique les rend capables de se recombiner entre virus proches lorsque plusieurs variants infectent une même cellule, voire même d'échanger du matériel génétique par réassortiment pour les virus à génome segmenté (Knipe and Howley, 2006). Il existe des virus pathogènes, mais aussi des virus dont l'infection n'a aucun symptôme délétère connu sur l'organisme. Certains virus peuvent s'intégrer au génome de leur hôte (rétrovirus) pour être ensuite libérés et recommencer à se répliquer ultérieurement. Ils existe également des virus pouvant être considérés comme bénéfiques (Knipe and Howley, 2006). Ainsi, l'intégration d'un rétrovirus a eu une importance capitale dans l'évolution des mammifères en leur permettant de produire certaines protéines indispensables pour le développement du placenta, et a permis l'évolution

d'animaux ovipares en animaux placentaires (Dupressoir et al., 2012; Knipe and Howley, 2006).

Ces éléments nous permettent de considérer les virus comme des organismes vivants, et plus précisément comme des acaryotes (organismes sans noyau) parasites intracellulaires obligatoires, puisqu'ils ont besoin d'infecter une cellule pour se répliquer.

b) Les virus de l'abeille

On dénombre au moins 31 virus de l'abeille domestique décrits dans la littérature (Remnant et al., 2017). La plupart d'entre eux sont des virus à ARN simple brin positif, mais il existe également des virus à ADN (*Filamentous virus* et *Iridovirus*), ainsi que, découverts récemment, des virus à ARN simple brin négatif (deux *Rhabdovirus* et deux *Bunya-like virus*) (Remnant et al., 2017). A l'exception des virus de type *Lake Sinai virus* et du *Chronic bee paralysis virus* (CBPV), les virus à ARN simple brin positif qui infectent l'abeille font partie de l'ordre des *Picornavirales*, qui regroupe des virus avec des petits génomes non segmentés qui ont tous une structure proche. Cependant, seulement une dizaine des 31 virus décrits sont à l'heure actuelle connus pour développer des symptômes visibles tels que des mortalités de couvain ou d'adultes, des paralysies, ou des ailes déformées, par exemple.

La présence de certaines de ces infections a été corrélée à des pertes de colonies, le *Deformed wing virus* (DWV) principalement lié à des pertes hivernales (Dainat et al., 2012a; Desai and Currie, 2016; Genersch et al., 2010; Highfield et al., 2009; VanEngelsdorp et al., 2013), et l'*Israeli acute paralysis virus* (IAPV) au CCD aux Etats-Unis (Cox-foster et al., 2007).

Une infection apparente, avec des signes cliniques visibles et définis, peut être déclenchée par différents facteurs, tels que la transmission du virus par *Varroa* pour les DWV et les virus du complexe AKI (comprenant les très proches *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV) et IAPV)(Carreck et al., 2010; Möckel et al., 2011); le *Varroa* peut également multiplier le DWV et sélectionner des variants spécifiques plus ou moins virulents (Martin et al., 2012). Certains pesticides sont également suspectés de pouvoir, par leur effet négatif sur le système immunitaire, déclencher ces infections apparentes et ce qui pourrait

aggraver voire déclencher des surmortalités ; cela a été observé en laboratoire (Di Prisco et al., 2013; Sánchez-Bayo et al., 2016). Les facteurs déclenchant les symptômes d'une infection virale dans les colonies ne sont donc pas encore réellement connus.

Cependant, il existe également des symptômes tels que des effets comportementaux ou la réduction de durée de vie des abeilles qui sont difficiles à observer sur le terrain, que ce soit par les apiculteurs ou les vétérinaires, (Benaets et al., 2017). Les virus de l'abeille domestique ont également la particularité d'infecter les colonies sans développer forcément de signes cliniques visibles ni de mortalités chez les abeilles infectées (Aubert et al., 2008). Ces types d'infections peuvent être rapportées à la notion de « porteurs sains » tant au niveau de la colonie que des individus qui la composent : les abeilles sont infectées, le virus est présent mais ne se multiplie pas dans des proportions suffisantes pour que les symptômes se développent. Pour caractériser ces infections, les termes d'infection inapparente, apparente, latente, chronique, persistantes, ne font pas toujours chez l'abeille référence aux vraies définitions de la virologie stricte, basées sur des découvertes au niveau moléculaire, *in vivo* et *in vitro* (de Miranda and Genersch (2010)). Le modèle abeille ne possédant à ce jour plus aucune culture cellulaire viable (le peu de lignées créées n'a pas fonctionné sur le long terme et était contaminée par DWV – *communication personnelle*), très peu de clones pour étudier les virus (Benjeddou et al., 2002; Lamp et al., 2016), et les études *in vivo* en étant à leur commencement, ces termes ne peuvent être appliqués de façon réaliste (de Miranda and Genersch, 2010). C'est pourquoi pour éviter toute confusion l'utilisation des termes *covert* et *overt* en anglais, utilisés pour parler des infections virales des insectes (Aubert et al., 2008, Chapitre 5), doivent être préférés à tout autre terme. Ces termes seront traduits au plus proche par « infections inapparentes » et « infections apparentes » dans la suite de ce texte.

Toujours d'après de Miranda and Genersch, 2010, une infection apparente sera caractérisée par des symptômes visibles et reliée à de fortes charges virales dans les individus. Les insectes infectés vont soit mourir de l'infection, soit survivre, et les charges virales vont ensuite diminuer. Les infections apparentes peuvent être subdivisées en infections aiguës et infections chroniques. Les infections aiguës sont de courte durée, provoquent des symptômes visibles, voire la mort. Un exemple en serait les mortalités élevées retrouvées devant les colonies lors de pics d'infection au CBPV (Rivière et al., 2010). Une infection chronique serait une infection provoquant une production de virus sur le long terme chez un individu,

Tableau 11 : Tableau de hiérarchisation des 18 dangers des abeilles, présents en France, selon la note finale pour chaque maladie (notation avec pondération des DC définie par le groupe de rapporteurs; note finale sur 60), en précisant l'indice d'incertitude (ii) modal.

Rang	Dangers	Note finale pondérée (sur 60)	Indice d'incertitude (ii*) modal
1	<i>Varroa destructor</i>	47,7	1
2	<i>Paenibacillus larvae</i>	47,6	1
3	DWV	37,3	1
4	<i>Vespa velutina</i>	36,0	1
5	<i>Melissococcus plutonius</i>	35,2	1
6	SBV	32,7	1
7	<i>Nosema ceranae</i>	32,6	1
8	CBPV	32,1	3
9	<i>Ascosphaera apis</i>	28,8	1
10	BQCV	28,2	1
11	ABPV	24,9	1
12	IAPV	24,9	3
13	KBV	24,9	3
14	<i>Nosema apis</i>	23,1	1
15	<i>Achroia grisella</i>	22,6	1
16	<i>Galleria mellonella</i>	21,9	1
17	<i>Acarapis woodi</i>	19,9	1
18	<i>Braula coeca</i>	17,9	1

ABPV = virus de la paralysie aiguë ; BQCV = virus de la cellule royale noire ; CBPV = virus de la paralysie chronique ; DWV = virus des ailes déformées ; IAPV = virus israélien de la paralysie aiguë ; KBV = virus du cachemire ; SBV = virus du couvain sacciforme.

*Indice d'incertitude : 1 = faible, 2 = moyen ; 3 = haut

Figure 6: Tableau de hiérarchisation des dangers les plus importants pour la santé des abeilles et l'apiculture (ANSES, 2012)

tout au long de sa vie. Il n'y a pour l'instant pas de preuves d'infections chroniques chez l'abeille.

Une infection inapparente (de Miranda and Genersch, 2010), elle, sera définie par i) une absence de symptômes apparents (même s'il peut toujours exister un coût pour l'individu infecté) alors que l'on retrouve des virus dans l'hôte, ii) la persistance des virus, à travers la transmission verticale, sur plusieurs générations (Burden et al., 2002; Kukan, 1999), et iii) des virus qui restent infectieux et capables de soudainement développer les infections apparentes ou *overt* décrites précédemment, sous l'influence de facteurs variés tels que ceux cités plus haut (4.b.) (Burden et al., 2003).

Sept des virus qui infectent *Apis mellifera* sont connus pour avoir une forte, voire très forte prévalence (taux de ruches ou de ruchers positifs par rapport à la population totale) en Europe et aux Etats-Unis (Tencheva et al., 2004, Genersh & Aubert, 2010, Traynor et al., 2016)(Berényi et al., 2006)(Forgách et al., 2008): les virus du complexe AKI (*Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV) et IAPV), le *Black queen cell virus* (BQCV), le CBPV, le DWV, et enfin, le *Sacbrood virus* (SBV)(Aubert et al., 2008; Laurent et al., 2015; Tentcheva et al., 2004)(voir ci-dessous).

c) Le virus des ailes déformées, ou DWV

Le *Deformed wing virus* ou virus des ailes déformées (DWV) est à présent l'un des virus de l'abeille domestique les plus étudiés. Il est reconnu pour avoir un impact économique important, et ce virus est classé 3ème dans la hiérarchie des dangers établie par l'Anses des maladies à fort impact sur les abeilles et l'apiculture (après *Varroa destructor* et la loque américaine *Paenibacillus larvae*, ANSES, 2012)(figure 6).

La présence combinée de *Varroas* et du DWV est considérée prédictive des mortalités hivernales (Dainat et al., 2012a), ce qui le classe comme une des principales causes de déclin de l'abeille domestique. Des études démontrent une forte corrélation entre des taux de DWV élevés dans les abeilles avant hivernage et des pertes de colonies durant l'hiver (Dainat et al., 2012a; Desai and Currie, 2016; Francis et al., 2013; Genersch et al., 2010; Traynor et al.,



Figure 7 : Quelques signes cliniques liés au DWV.

A) abeilles aux ailes déformées et/ou atrophiées (photographies Anne Dalmon, INRA) ; B) observation d'un *Varroa* à la loupe binoculaire (photographie Anses) ; abeilles portant des *Varroas* observées sur le terrain (photographie Anne Dalmon, INRA).

2016; VanEngelsdorp et al., 2013). Le DWV, avec *Nosema ceranae*, *Varroa destructor*, et des taux bas de la protéine vitellogénine ont été reliés avec un risque élevé d'occurrences de CCD en Europe (Dainat et al., 2012b). Le DWV est le virus le plus souvent détecté des virus de l'abeille domestique en Europe (97% de prévalence en France, 91% en Autriche et 72% en Hongrie (Berényi et al., 2006; Forgách et al., 2008; Tentcheva et al., 2004). Cependant, il n'existe pas de données pour la prévalence des signes cliniques correspondant à l'infection virale, bien que les apiculteurs signalent souvent observer des abeilles à ailes déformées.

En effet, le symptôme le plus facile à observer d'une infection au DWV est la présence d'abeilles naissantes aux ailes déformées dans la ruche, à une fréquence dépendant de la période de l'année (de Miranda and Genersch, 2010a)(figure 7). Ces abeilles, qui peuvent aussi présenter des abdomens raccourcis et enflés, vont mourir dans les quelques jours suivant leur émergence. Le DWV a également un impact négatif sur la survie des abeilles infectées (Rueppell et al., 2017), ainsi que des effets sublétaux. Il cause des sorties de butinage précoces (Benaets et al., 2017), des problèmes de locomotion et des durées de vol réduites en laboratoire (Wells et al., 2016), ainsi qu'une diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation, et une augmentation de la sensibilité olfactive au sucre (Iqbal and Mueller, 2007).

i) Structure, classification

Le DWV est un virus à ARN simple brin positif non segmenté codant pour une seule polyprotéine qui sera ensuite clivée en protéines structurales (formant la capsid) ou non structurales (Lanzi et al., 2006; Škubník et al., 2017), intervenant notamment dans la réplication virale. Non enveloppé, il présente une capsid icosaédrique (polyèdre à vingt faces), dont la structure a été décrite récemment par Škubník et al., 2017 (figure 8). C'est un virus de la famille *Iflaviridae* et du genre *Iflavirus*. Cette famille fait partie de l'ordre des *Picornavirales*, qui peuvent infecter des hôtes très hétérogènes, des vertébrés aux plantes en passant par les insectes. Les iflavirus (dont le SBV est aussi un représentant) n'infectent que des insectes (ICTV, <https://talk.ictvonline.org>, consulté le 07/08/2017). Possédant un seul ORF (pour Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert), ils se distinguent des virus de la famille *Discitroviridae* (avec comme représentant le BQCV). L'ARN du DWV possède une

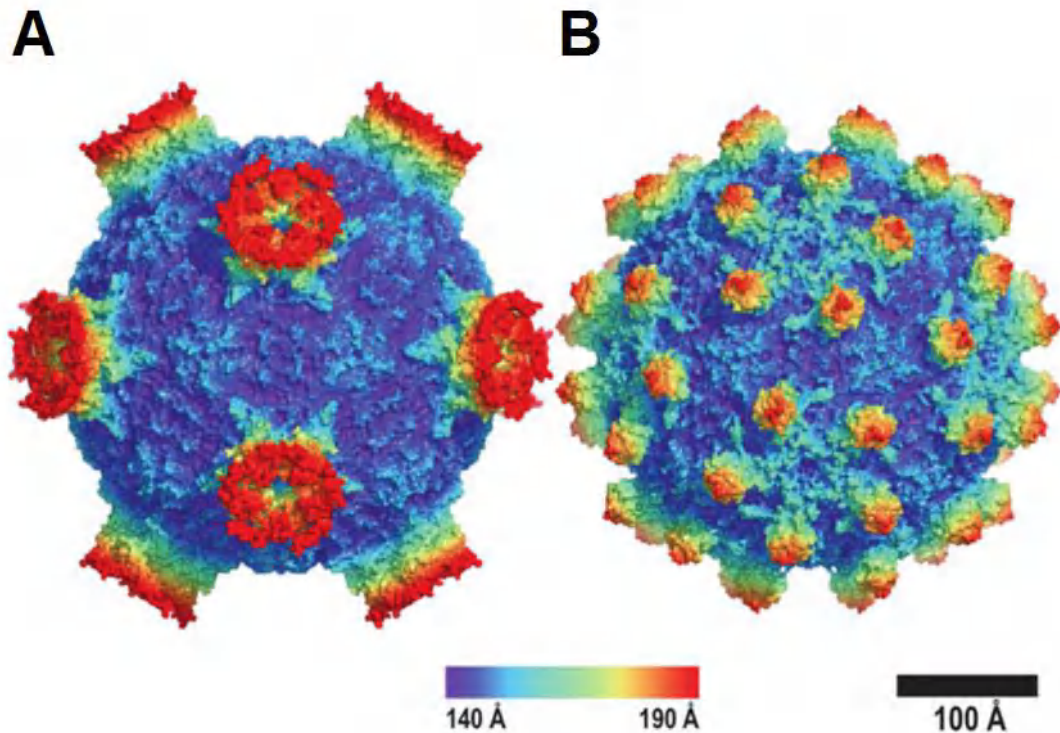


Figure 8 : La structure moléculaire de la capside du DWV (d'après Škubník et al., 2017). Il existe deux conformations alternatives en fonction du pH (A, pH neutre ; B pH bas (<5)). Les couleurs correspondent à l'éloignement de la surface par rapport au centre de la particule.

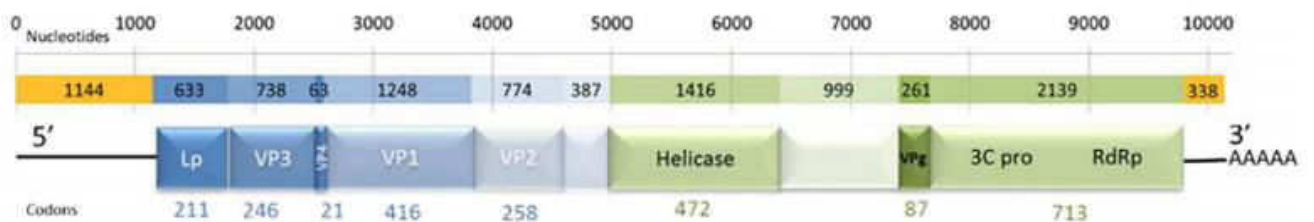


Figure 9 : La structure du génome du DWV (d'après Dalmon et al., 2017b). Le génome total fait 10 140 nucléotides. La position supposée des protéines a été adaptée de de Miranda and Genersch, 2010a. Première ligne : échelle nucléotidique ; deuxième ligne : nombre de nucléotides codant pour chaque protéine (les protéines structurales sont en bleu, les non-structurales en vert, les régions non codantes en jaune) ; troisième ligne : noms correspondants à chaque protéine ; quatrième ligne : longueur des protéines, déduites des sites protéolytiques (nombre de codons).

longue région non transcrite (UTR, untranslated region) en 5', et une autre courte mais très conservée en 3' ainsi qu'une queue poly-A (figure 9). Ces deux régions non transcrites flanquent 3 protéines structurales majeures du côté N-terminal de la polyprotéine (VP1 de 44kDa ; VP2 de 32 kDa ; et VP3 de 28 kDa), ainsi que les protéines non structurales intervenant dans la réplication des picornavirales en partie C-terminale (hélicase, une chymotrypsine-like 3C protease, et une ARN polymérase ARN dépendante) de Miranda and Genersch, 2010; Lanzi et al., 2006). Le DWV a été récemment décrit comme une quasi-espèce, regroupant plusieurs variants (A, B, ou C) dont deux (A, B) sont particulièrement répandus. Le DWV-A correspond à la séquence originelle du DWV tandis que le DWV-B correspond à ce qui il y a encore quelques années était appelé le VDV- 1, pour *Varroa destructor virus type 1*, qui formeraient un ensemble de variants de DWV (Mordecai et al., 2015). Le DWV-C n'a été identifié à ce jour que dans le Devon, UK (Mordecai et al., 2016). Plusieurs virus recombinants entre les DWV-A et B ont été observés et caractérisés. Notamment, des virus recombinants découverts en France dans des colonies résistantes au *Varroa* indiqueraient l'existence de trois hotspots (points chauds) de recombinaison : un dans le 5' UTR, un au début de la région codant pour les protéines de structure, et enfin un dernier au début de la région codant pour l'hélicase (Dalmon et al., 2017).

Le DWV a été retrouvé comme se répliquant spécifiquement dans le corps gras des reines et faux-bourçons (non testé sur ouvrières) (Fievet et al., 2006), dans les intestins (Doublet et al., 2015b) et surtout dans la tête des ouvrières dans le cas d'infections déclarées (Möckel et al., 2011; Yue and Genersch, 2005).

ii) *Ecologie*

Le DWV peut se transmettre de façon verticale de la reine (qui peut parfois être infectée lors de l'accouplement par le mâle (Amiri et al., 2016)) aux œufs (de Miranda and Fries, 2008). Il peut également être transmis par voie orale lors de la trophallaxie, ou lorsque les nourrices détruisent les larves contaminées ou nettoient les alvéoles (Aubert et al., 2008; de Miranda and Genersch, 2010). Enfin, le vecteur majeur du DWV est l'acarien *Varroa destructor* (Bowen-Walker et al., 1999; Mondet and Le Conte, 2015).

Avant l'arrivée du *Varroa* dans les ruchers d'*Apis mellifera*, à l'exception de quelques rares signalements d'abeilles possédant des ailes déformées, le DWV était en général présent dans les ruchers, quoiqu'avec une faible prévalence, sans causer d'infections apparentes ni d'affaiblissement notable des colonies (Forsgren et al., 2012), via la transmission verticale et horizontale de virus peu virulents (Aubert et al., 2008; de Miranda and Genersch, 2010). *Varroa destructor*, en transmettant le virus aux abeilles lors de prélèvement d'hémolymphe, est en général à l'origine du développement des symptômes spécifiques du DWV, mais l'on peut observer, de façon extrêmement rare, des abeilles possédant des ailes déformées sans présence de *Varroas* (Forsgren et al., 2012). Ce développement des symptômes après inoculation du virus par le vecteur est liée à une multiplication du virus dans le *Varroa*. Le brin ARN négatif du virus, signe d'une réplication, a en effet été retrouvé dans certains *Varroas*. Les abeilles infectées par injection par *Varroa* auront donc plus de facilité à franchir le seuil de 10^8 copies de DWV (de Miranda and Genersch, 2010; Miranda et al., 2013) par abeille qui entraîne l'apparition des symptômes. En effet, le symptôme principal du DWV, les ailes déformées sur des abeilles naissantes, a été lié à une forte augmentation de charges injectées dans les nymphes par *Varroa*, (de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011). De plus, l'inoculation s'accompagne de l'injection de composés ayant un impact négatif sur le système immunitaire de l'abeille qui favorisent la multiplication du virus dans l'abeille hôte (Gisder et al., 2009; Yang and Cox-Foster, 2005). *Varroa* contribue également à la sélection de variants plus virulents (Martin et al., 2012).

C'est la faible virulence originelle du DWV qui aurait permis son association durable et effective avec le *Varroa* (de Miranda and Genersch, 2010; Genersch and Aubert, 2010). En effet, les autres virus dont *Varroa* est vecteur (ABPV, KBV, IAPV) tuent les abeilles ou les larves trop vite pour permettre une propagation optimale du parasite (Lanzi et al., 2006).

Cependant, la présence de DWV a été démontrée comme étant corrélée à 67% des pertes de colonies observées sur 5 différents ruchers, colonies qui ne présentaient pas forcément toutes une infestation élevée en *Varroa* (Highfield et al., 2009). Ceci va donc à l'encontre de la plupart des études précédentes sur le sujet (Yang and Cox-Foster, 2005; Yue and Genersch, 2005), en soulignant que le DWV seul pourrait être à l'origine de pertes. Cette différence pourrait être expliquée par une forte concentration en *Varroa* lors de l'été et du printemps, qui induirait de forts taux de DWV persistant dans les abeilles après que le traitement généralement fait à l'automne contre les *Varroas* les ait éliminés (Genersch et al., 2010).

La prévalence très élevée du DWV, associée à ses effets déjà connus sur les colonies, notamment lors de l'hivernage (Dainat et al., 2012a; Highfield et al., 2009) ainsi que les effets sublétaux individuels qu'il peut causer (Benaets et al., 2017; Iqbal and Mueller, 2007; Wells et al., 2016), en font un candidat idéal pour l'étude de la co-exposition avec un insecticide.



Figure 10 : Quelques signes cliniques liés au CBPV.

A) Abeilles mortes devant une ruche infectée par le CBPV ; B) Abeille atteinte de maladie noire (crédits photographiques : © ANSES et Jean-Paul Faucon)

d) Le virus de la paralysie chronique, ou CBPV

Le CBPV est différent des autres virus des abeilles, par son classement, sa forme, sa taille, ses symptômes et sa répartition. Ses signes cliniques sont connus depuis l'antiquité, avec notamment des abeilles noires et sans poils décrites comme des « voleuses » venues piller la ruche par Aristote (Ribière et al., 2010). Le CBPV est bien connu des apiculteurs sous le nom de maladie noire, ou de mal de mai.

Une partie des symptômes de la paralysie chronique se traduit par des abeilles ayant perdu leurs poils, ce qui leur donne un aspect très différent, et/ou ayant pris une couleur noire et un aspect brillant (Figure 8 B). Cependant les symptômes les plus caractéristiques sont des tremblements, des abeilles incapables de voler, des paralysies, et enfin une accumulation d'abeilles mortes en grande quantité devant les ruches. Ce dernier symptôme peut être confondu avec les symptômes induits par des expositions aiguës aux pesticides (Johansen, 1977) (Figure 8 A).

Le CBPV est assez prévalent, notamment en France, mais ne présente qu'un faible taux de maladie déclarée (symptômes visibles communiqués par les apiculteurs) (2% de signes cliniques, EPILOBEE entre 2012 et 2014 (Laurent et al., 2015)). Ce pourcentage restant plus élevé que dans tous les autres pays suivis dans le programme. En France une étude réalisée sur 360 colonies (Tentcheva et al., 2004) a mis en évidence que 28% des ruchers étaient infectés par le CBPV, mais peu de colonies infectées (moins de 4% des colonies échantillonnées en été). En Autriche, seulement 10% des ruchers testés étaient infectés (Berényi et al., 2006) et aucun en Hongrie (Forgách et al., 2008).

Le CBPV n'appartient pas à l'ordre des *Picornavirales* contrairement à la majorité des virus qui infectent l'abeille domestique. Le CBPV n'est pas encore classifié, mais il a pour l'instant été rapproché des familles *Nodaviridae* (une famille de virus à ARN positif simple brin généralement segmentés en 2 segments, de capsidie icosaédrique, non enveloppés, infectant des invertébrés et des vertébrés, notamment des poissons) et *Tombusviridae* (une famille de virus à ARN positif simple brin en général non segmentés, de capsidie icosaédrique, non enveloppés, infectants principalement des plantes) (ICTV, <https://talk.ictvonline.org>,

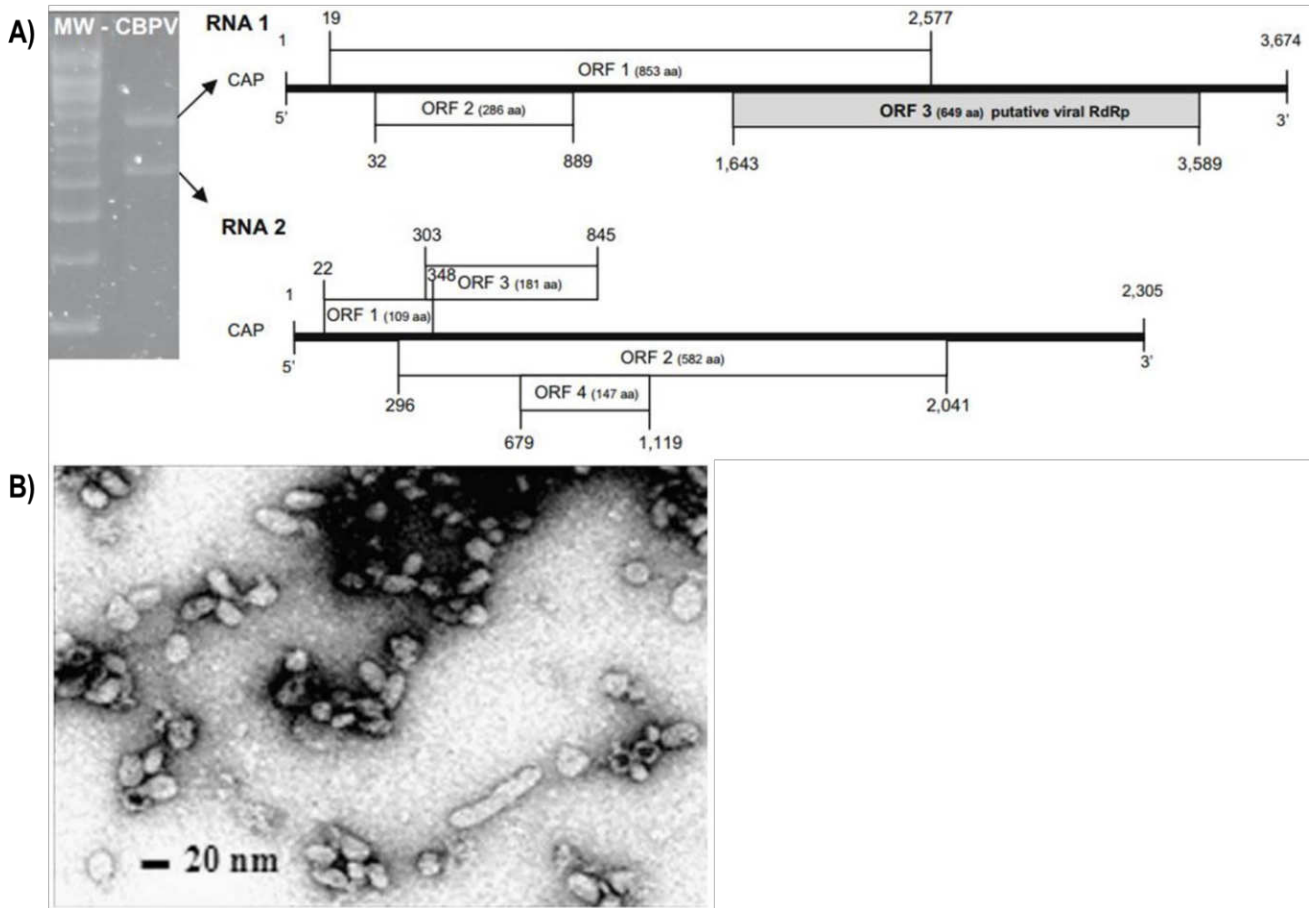


Figure 11 : Structure et génome du CBPV.

A) Structure du génome et B) photographie en microscopie électronique du CBPV (tiré de Ribière et al., 2010)

consulté le 07/08/2017) (Figure 11 B). Il est parfois identifié comme un *Parachrovirus* (pour paralysie chronique, classification créée pour le CBPV) (Blanchard et al., 2007).

i) Structure, classification

Le CBPV possède une capsidie anisométrique (ne présentant pas de géométrie particulière) de 20 à 60 nm. Son génome est composé de deux segments d'ARN positif, simple brin (figure 11 A). Le segment 1, de 3674 bases, possède 3 cadres ouverts de lecture (ORF) chevauchants ; le segment 2, de 2305 bases, présente 4 ORF chevauchants. Ces segments ne possèdent pas de queue poly-A en 3' mais sont coiffés à leur extrémité 5'. Il est prédit que l'ORF3 du segment 1 code pour l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), tandis que les ORF2 et 3 du brin 2 pourraient encoder des protéines structurales (Blanchard et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2010, 2007; Youssef et al., 2015).

Le CBPV démontre un certain neurotropisme, ce qui est cohérent avec les symptômes de paralysie qu'il cause (Chevin et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2007). Les mécanismes d'action spécifiques du CBPV sur les cellules ne sont pas encore connus.

ii) Ecologie

Il n'existe aucune évidence de transmission du CBPV par l'acarien *Varroa destructor* (Celle et al., 2008). Les infections inapparentes (*covert*), identifiées comme étant nombreuses pour ce virus, peuvent cependant évoluer en infections apparentes (*overt*), avec signes cliniques visibles, après que les abeilles de ruches populeuses ont été confinées pour de longues périodes de temps, en général en sortie d'hivernage et dû à un temps médiocre au printemps (Ribière et al., 2010). Ce virus est en effet capable de se transmettre de façon horizontale, outre par trophallaxie ou transmission oro-fécale, seulement par contact, en particulier lorsque les abeilles se frottent les unes contre les autres, abrasant leur cuticule (Ribière et al., 2010).

La plupart des ruches positives pour le CBPV mais sans signes cliniques possèdent des taux de virus par abeille détectables, souvent quantifiables mais relativement bas, aux

alentours de 10^4 copies de génome par abeille (la limite de quantification pour le CBPV se situant à $10^{3.9}$ copies de génome par abeille (Blanchard et al., 2007)). Ce taux est plus élevé chez les individus développant des symptômes, où il dépasse généralement 10^8 copies de génome de CBPV par abeille (Blanchard et al., 2012; Chevin et al., 2012).

L'intérêt porté dans cette thèse au CBPV est lié à plusieurs rapports internes à l'ANSES sur l'observation d'abeilles présentant certains symptômes coïncidant avec ceux du CBPV, comme des abeilles tremblantes et incapables de voler, et/ou des tas d'abeilles mortes, devant des ruches qui auraient été exposées, ou butinant près de champs de colza traités au Cruiser®, un pesticide contenant du thiaméthoxam (ANSES, 2015).

e) Les réponses de l'abeille aux pathogènes

D'autres pathogènes que les virus affectent les abeilles. Cependant à quelques exceptions près, les réponses immunitaires individuelles ou sociales que déploient les abeilles ne sont pas spécifiques et s'appliquent à plusieurs, et peut-être à tous les pathogènes susceptibles de les infecter (Doublet et al., 2017; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

i) Immunité sociale

La vie en colonies de plusieurs milliers d'individus réunis en un seul endroit peut présenter des avantages comme des inconvénients. En effet, la colonie, avec sa relative homéostasie, notamment sa température relativement stable autour du couvain (environ 34°C) (Bruneau et al., 2006), une humidité forte et régulée, une concentration de ressources venant de l'extérieur, ainsi que sa forte densité d'individus génétiquement proches (demi-sœurs), est une cible très attractive pour les parasites et les pathogènes (Evans and Spivak, 2010; Gherman et al., 2014).

Cependant, elle offre également, tout spécifiquement pour l'abeille domestique, une grande variété de barrières et comportements sociaux permettant de diminuer, voire d'éliminer ces pathogènes et parasites.

Les ouvrières de la colonie sont capables de développer des interactions comportementales coordonnées telles que le toilettage (ou épouillage) – de l'abeille elle-même, ou le toilettage mutuel entre abeilles, ou certains comportements hygiéniques spécifiques. Les abeilles détectent et éliminent, par éjection de la ruche ou cannibalisme, le couvain infesté par des parasites (type *Varroa*) et/ou infecté par des pathogènes (virus ou bactéries), et les abeilles malades ou mortes (Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

Les abeilles peuvent aussi réguler ou modifier l'environnement interne de leur colonie de plusieurs façons (Evans and Spivak, 2010). L'environnement peut par exemple être modifié par l'apport et l'application de mixtures de résines de plantes appelées propolis, possédant des propriétés antifongiques et antibiotiques. Il a été observé qu'un apport de propolis réduisait l'investissement individuel des abeilles dans leur immunité, notamment en entraînant une baisse des coûts énergétiques pour ces abeilles (Simone et al., 2016). Les abeilles ont également à leur disposition dans leur nourriture (nectar, pollen, miel) des éléments antifongiques et antibiotiques. Elles sont capables de changer d'alimentation pour contrer une infection. Ainsi, des abeilles infectées par *Nosema* choisiraient préférentiellement du miel de tournesol par rapport à d'autres miels : le miel de tournesol contient significativement plus de molécules antibiotiques, et aurait pour effet de diminuer significativement la quantité de microsporidies comparativement à d'autres miels (Gherman et al., 2014). La consommation de miel (en apportant de l'acide para-coumarique) a également été observée comme un déclencheur de certaines réponses immunitaires, telles que la production de peptides antimicrobiens (Mao et al., 2013).

L'essaimage d'une partie de la population peut permettre de diminuer les populations de certains parasites comme le *Varroa*, et de créer une nouvelle colonie moins parasitée (Kurze et al., 2016). En effet, le *Varroa* se reproduisant uniquement dans le couvain operculé, le nouvel essaim constitué d'abeilles adultes aura une pression parasitaire réduite. De plus, la période d'installation du nouvel essaim, sans couvain, va encore ralentir l'infestation (Fries et al., 2003; Kurze et al., 2016). L'essaimage pourrait ainsi permettre de freiner également les virus dont le *Varroa* est un vecteur (particulièrement le DWV et les virus du complexe AKI)(Kurze et al., 2016). Il existe également sur le même principe, particulièrement observé chez les abeilles africanisées, la stratégie de désertion (« absconding ») à des conditions trop défavorables. Toute la colonie quitte subitement la ruche en abandonnant le couvain et les réserves pour créer un nouveau nid (Kurze et al., 2016; Winston, 1987).

L'organisation sociale de la colonie peut aussi être une barrière à l'exposition, à la transmission, et à l'infection aux pathogènes. Elle peut être qualifiée d'« immunité organisationnelle » (Naug and Smith, 2007), l'organisation sociale de la colonie en castes séparées permettant de freiner la propagation des maladies. En effet, les abeilles qui effectuent les tâches hygiéniques telles que les éliminations de larves contaminées ou abeilles mortes sont déjà moins en contact avec la reine ni le couvain (tâches qu'elles effectuent plus jeunes, voir paragraphe 1, et figure 2). Les butineuses, qui sont potentiellement les plus infectées car en contact avec l'environnement extérieur (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010), ne sont en contact avec les autres abeilles que pour restituer leurs collectes et quittent régulièrement la ruche, ce qui réduit encore les possibilités d'échange direct de pathogènes. Les abeilles infectées, notamment par *Nosema sp.* ou le SBV, sont connues pour avoir tendance à butiner plus tôt, ce qui réduit leurs chances de propager les pathogènes qu'elles portent (Bailey and Fernando, 1972; Hassanein, 1953).

Enfin, une dernière barrière de la colonie à la transmission et l'infection par les parasites et pathogènes peut-être apportée par la multiplication des mâles avec lesquels une reine va s'accoupler : en effet ceci apporte une diversité génétique des individus au sein de la ruche (demi-sœurs), ce qui peut freiner la propagation des maladies (Brutscher et al., 2015; Evans and Spivak, 2010). Mais cet éventuel effet bénéfique peut être contrebalancé par la transmission de pathogènes lors de l'accouplement (Amiri et al., 2016).

La colonie a besoin d'un nombre important d'individus pour maintenir son homéostasie et son développement optimal – il a été observé qu'une trop forte perte de population peut entraîner un effondrement par perte de résilience (Perry et al., 2016). Cependant, une multiplication extrême des individus dans un environnement clos augmentera le risque de transmission des pathogènes (par exemple du CBPV) par multiplication des contacts et relations entre individus (Evans and Spivak, 2010; Ribière et al., 2010).

ii) Immunité individuelle

En plus de l'immunité apportée par la colonie, les abeilles déploient des réponses immunitaires individuelles. L'immunité acquise (anticorps) n'ayant à ce jour pas été observée chez les insectes, on ne parlera ici que d'immunité « innée ».

Les abeilles, contrairement aux insectes modèles *Drosophila melanogaster* (mouche drosophile) et *Anopheles gambiae* (moustique anophèle), possèdent une proportion réduite (environ 1/3 seulement) de gènes codant pour des éléments entrant en jeu dans la réponse immunitaire (Evans et al., 2006). Ceci pourrait être expliqué par l'existence de l'immunité sociale et donc un investissement moindre dans l'immunité individuelle. Cependant, la plupart des composants de base des voies de réponse immunitaire connues chez *D. melanogaster* et *An. gambiae* sont présents chez l'abeille domestique.

Les stratégies individuelles généralement développées par les insectes regroupent : la barrière physique et physiologique de l'épithélium et de la cuticule, épaisse, qui peut produire dans certains cas des sécrétions antimicrobiennes, un environnement intestinal hostile aux pathogènes (pH bas), et enfin des réponses cellulaires et humorales. Les réponses cellulaires servent principalement à l'immobilisation des pathogènes, par les hémocytes circulants dans l'hémolymphe (les plasmatocytes et lamellocytes qui phagocytent ou encapsulent les agents pathogènes, et les cellules à cristaux qui permettent la mélanisation, qui va conduire à « l'étouffement » du pathogène en fixant des molécules de mélanine tout autour, puis à la phagocytose). Les réponses cellulaires (ou humorales) utilisant des cascades de signalisation, (conduisant à la production de peptides antimicrobiens (AMP) ou d'autres protéines effectrices et/ou enzymes de dégradation) s'effectuent en général dans le corps gras. On observe également la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'ARN-interférence (RNAi), qui est un des mécanismes majeurs de la réponse antivirale chez les drosophiles et les anophèles (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010).

Il existe chez l'abeille quatre voies différentes de signalisation : Toll, Imd, Jak/STAT et JNK (figure 12).

Brièvement, la voie Toll, au départ découverte chez les drosophiles, est à la fois une voie impliquée dans l'immunité et le développement de l'insecte, et réagit principalement aux bactéries Gram-positives et aux champignons. Les récepteurs Toll et Toll-like sont des protéines transmembranaires capables de reconnaître certains motifs moléculaires spécifiques. La partie qui se trouve à la surface des membranes cellulaires va réagir à la fixation de molécules « cytokine-likes » (cytokine : molécule de signalisation cellulaire générale) telles

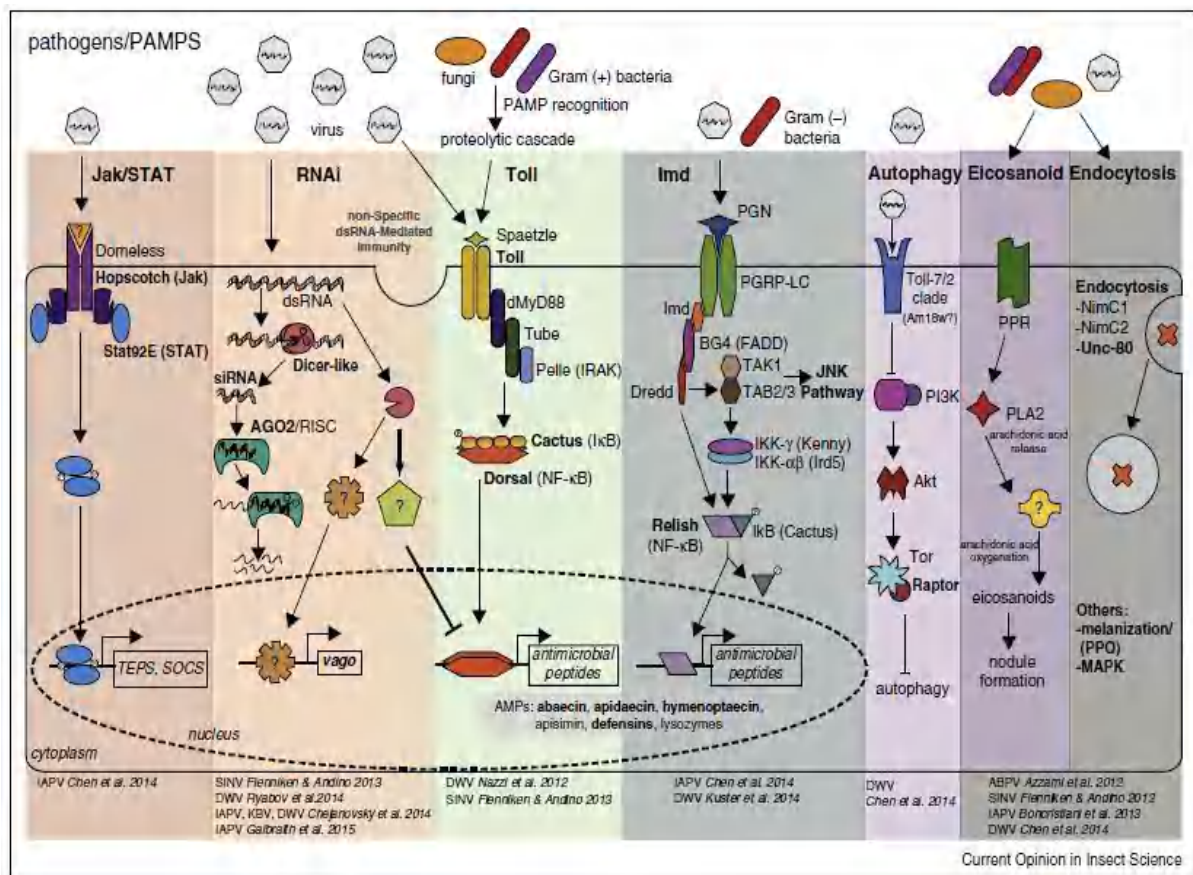


Figure 12 : l'immunité antivirale chez *Apis mellifera* (tiré de Brutscher et al., 2015)

Légende : Jak/STAT = Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription ; TEPS= protéines contenant des thioester ; SOCS = suppresseurs du signal des cytokines ; RNAi = ARN interférence ; dsRNA = ARN double brin ; siRNA = petits ARN interférents ; Ago2 = protéine Argonaute ; RISC = complexes ribo-protéiques (Agaisse et al., 2004) ; PAMPs = motifs moléculaires associés aux pathogènes ; PGN = protéines reconnaissant le peptidoglycane ; PGRP-LC = protéines reconnaissant le peptidoglycane LC ; JNK = c-Jun N-terminales Kinases ; PPO = Pro-phenoloxydase ; MAPK = protéines kinases activées par la mitose ; NF-κB = facteur nucléaire κB (Brutscher et al., 2015)

que Spätzle, et former un complexe. La formation et l'activation de ce complexe vont entraîner la dégradation de l'inhibiteur de la voie NFκB Cactus (IκB, inhibiteur de κB). La voie NFκB (pour Nuclear Factor κB) ainsi libérée provoquera la transcription, traduction, puis la translocation dans le noyau du facteur de transcription Dorsal, ce qui aboutira à la production d'effecteurs tels que des AMP (Anti-Microbial Peptides ou peptides anti-

microbiens) ou des lysozymes (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006). L'abeille possède cinq AMP (l'abaecin, apidaecin, hymenoptaecin, apisimin, defensin), qui sont de petites protéines aux propriétés antibiotiques variées selon les pathogènes et les voies de signalisation qu'ils déclenchent. L'abeille possède également des lysozymes ; ce sont des glycosides hydrolases : elles catalysent l'hydrolyse du peptidoglycane des bactéries Gram positives, détruisant ainsi leur paroi (Evans et al., 2006).

Voies de signalisation :

La voie Imd (pour « immune deficiency », déficience immunitaire) est plus spécifique à la défense antimicrobienne et réagit surtout aux champignons et aux bactéries Gram-négatives. Suivant le même type de cascade que la voie Toll, puisque le composant de la voie NFκB libéré par Cactus est ici Relish aboutissant également à la production d'AMP, ou à l'activation d'une mélanisation par l'intermédiaire de la pro-phénoloxydase. Cette voie peut également mener à l'activation de la voie JNK (pour c-Jun N-terminales Kinases), (Evans et al., 2006). La voie JNK est ainsi associée à la voie Imd car elle joue un rôle clé dans le devenir des cellules, leur morphogénèse et les réponses de ces dernières aux stress, et donc peut conduire à l'apoptose de la cellule infectée.

La voie Jak/STAT (pour Janus kinase/transducteurs de signaux et activateurs de transcription) réagit aux bactéries et virus (chez la drosophile). Elle permet l'induction d'une multitude de signaux et de facteurs complémentaires et une prolifération des hémocytes. Chez la drosophile, son activation stimule l'activité phagocytaire des hémocytes (Evans et al., 2006). Elle est communément associée aux infections virales chez les insectes et est probablement une réponse au stress et aux dommages cellulaires dus à l'infection (Brutscher et al., 2015).

Les virus ont été très peu étudiés comme cibles de ces différentes voies de la réponse immunitaire. Les cascades de transduction ont été surtout étudiées dans le cadre d'infections fongiques ou bactériennes d'autres insectes (Brutscher et al., 2015; Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010). Cependant, plusieurs expériences ont observé l'activation de l'une ou de plusieurs de ces voies lors d'une infection virale. Dorsal, effecteur de la voie Toll, codé par le gène *dorsal-1A* chez l'abeille, a été observé comme étant un composant clé permettant de limiter l'infection par le DWV (Nazzi et al., 2012). Les auteurs montrent que si la transcription de *dorsal-1A* est diminuée, les charges en DWV augmentent de façon significative. Une hausse de l'expression de certains composants de la voie Toll (Toll-6, Cactus, et surtout Argonaute-2) a également été observée lors d'une infection par IAPV chez de jeunes abeilles ; cependant cette activation n'a pas été observée dans des abeilles infectées naturellement (Galbraith et al., 2015).

Bien qu'ils soient effectivement produits en réponse aux infections virales, le rôle spécifique des AMP (abaecine, apidaecine, hymenoptaecine, apisimine, defensines, ainsi que des lysosymes) dans la défense contre les virus est inconnu (Brutscher et al., 2015).

RNAi :

Une seule voie est connue pour être spécifique aux virus chez les insectes : la voie de l'ARN interférence. Cette voie est le mécanisme majeur de la défense antivirale chez les modèles drosophile et anophèle. C'est une réponse séquence-spécifique, qui interfère avec l'expression des gènes (gene silencing). Elle est déclenchée par la présence dans la cellule d'ARN double brin (ARNdb), qui est un intermédiaire de la réplication des virus à ARN (Evans et al., 2006; Evans and Spivak, 2010). L'ARNdb peut ainsi être considéré comme un motif moléculaire associé aux virus, qui sera ciblé par le RNAi. La présence d'ARNdb dans la cellule va entraîner la production de siRNA (small interfering RNA, ou petits ARN interférents) par découpage de l'ARN double brin par l'endonucléase Dicer. Les petits ARN sont assemblés à un complexe ribo-protéique (Risc) dans lequel ils seront dégradés en ARN simple brin (ARNsb). Ces complexes pourront à leur tour se fixer sur de l'ARN à la séquence correspondante permettant son clivage par la protéine Ago2 (figure 13) ou promouvoir la production de la protéine vago. Vago est connue pour avoir une activité antivirale chez la drosophile et le moustique *Culex quinquefasciatus* (Blair and Olson, 2015). Divers tests

effectués en traitant ou prétraitant des abeilles avec des ARNdb spécifiques de certains virus avant ou pendant une infection par ces virus, ont montré des résultats significatifs, tels qu'une augmentation de la survie, une baisse des charges en IAPV (Maori et al., 2009), ainsi qu'une augmentation de la taille de la colonie et de la récolte de miel après que les colonies aient ingéré de la nourriture contenant des ARNdb spécifique de l'IAPV (Hunter et al., 2010). Un prétraitement avec des ARNdb de larves et d'adultes avant infection au DWV a également résulté en de plus faibles charges et une survie accrue (Desai et al., 2012). Ce mécanisme pourrait ne pas être complètement séquence-spécifique, puisque (Flenniken and Andino, 2013) ont montré une diminution des infection virales qui était indépendante de la séquence d'ARNdb administrée.

La diversité des résultats provenant d'études différentes sur les voies de l'immunité cellulaire souligne la spécificité et l'importance variable de chaque type de réponse dans le cadre de l'interaction entre un virus et l'abeille. Les différences d'observations peuvent également provenir de protocoles différents utilisés dans chacune des études (Brutscher et al., 2015). Par exemple les essais ont pu utiliser différents types d'infections : naturelle, injection, ou infection orale, différents temps post-infection auquel les tests et les dosages sont réalisés, ainsi que des variations plus difficiles à contrôler telles que des variations de souches dans les inocula de virus, des variations entre colonies, dans le microbiote des abeilles et/ou de la ruche elle-même, ou encore la présence préexistante d'autres pathogènes. Ainsi, des abeilles avec des fonds génétiques différents vont avoir des réponses différentes en fonction des infections auxquelles elles seront exposées, ou elles auront par exemple un nombre de cellules immunitaires circulantes plus ou moins élevé avant infection, et cela pourra engendrer des augmentations plus ou moins fortes de ce nombre ; ceci a été observé chez la drosophile (Lazzaro, 2004). Enfin, les interactions avec d'autres stress pourront également avoir un impact : ainsi il a été démontré que la transcription de *dorsal-1a* était diminuée uniquement quand *Varroa* et DWV étaient tous les deux présents (Nazzi et al., 2012).

iii) Tolérance versus résistance

La résistance est la capacité d'un organisme à limiter les quantités de pathogènes ou parasites. Ainsi, les réponses, immunitaires, sociales ou individuelles, aux pathogènes qui viennent d'être décrites font partie des phénomènes de résistance aux pathogènes. Cependant,

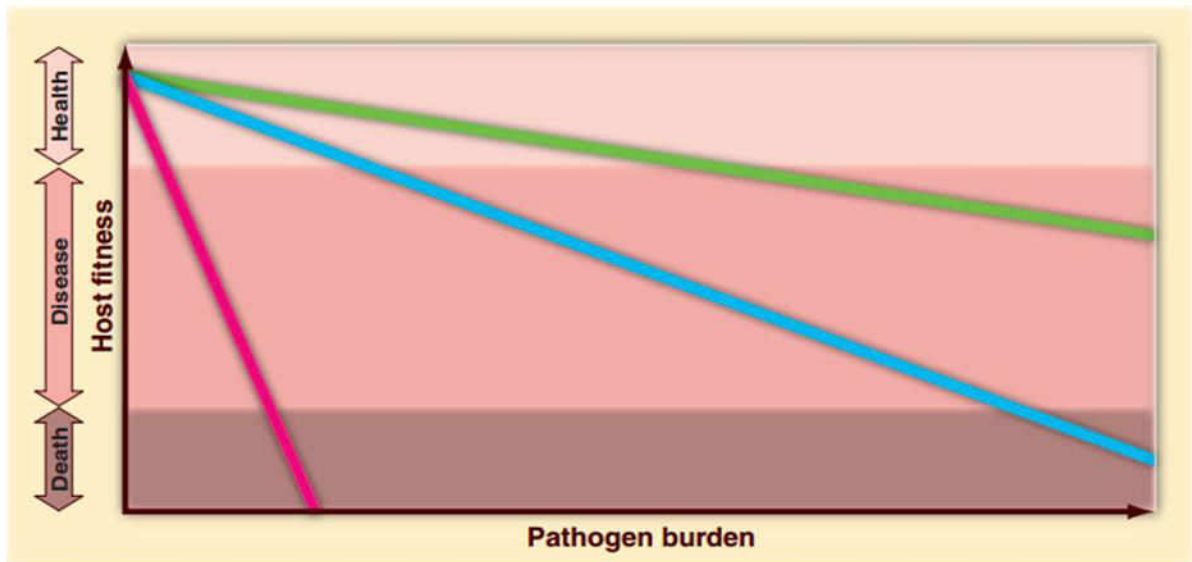


Fig. 2. Different tissues and physiological processes vary in tolerance capacity. Tissues depicted in red have the lowest tolerance to damage, the blue has an intermediate tolerance, and the green has the highest tolerance capacity.

Figure 13 : Variation de la tolérance de différents tissus et/ou processus physiologiques soumis à différentes charges pathogènes (tiré de Medzhitov et al., 2012).

il existe un autre type de réponse aux pathogènes qui peut permettre à l'organisme de conserver ses capacités adaptatives et à se reproduire (« fitness ») lors d'une infection : la tolérance. La tolérance limite l'impact des pathogènes sur l'individu, par des mécanismes n'étant pas en lien direct avec l'immunité (Evans and Spivak, 2010; Medzhitov et al., 2012; Schneider and Ayres, 2008). La tolérance pourrait également être envisagée comme englobant les mécanismes qui permettent de limiter l'impact que les réponses immunitaires peuvent avoir sur l'individu lui-même telles que le cout énergétique ou les détériorations de tissus associés à la résistance.

Ce type de réponse peut intervenir en complément des réponses de type résistance, mais peut également être une stratégie évolutive à part entière. En effet, la tolérance, en ne s'attaquant pas directement au pathogène, aura moins tendance à provoquer une course aux armements évolutive (théorie de la Reine Rouge (Liow et al., 2011)). Notamment, en l'absence de pression de sélection sur les pathogènes, la tolérance pourra permettre d'éviter de sélectionner les pathogènes les plus virulents (Schneider and Ayres, 2008).

Les biologistes des plantes, qui ont les premiers décrit cette notion de tolérance (Medzhitov et al., 2012; Soucha-Machado, 1982), la définissent comme correspondant à la pente d'une droite mettant en relation le phénotype d'un individu (sa santé, sa capacité reproductive, ou sa fitness) en fonction de différents environnements (stress) ou, ce qui nous intéresse ici, de quantités croissantes de parasites/pathogènes. La tolérance est appréciée en comparant les pentes de différentes droites issues de différents essais. Par exemple, les plantes plus tolérantes à une infection auront un meilleur état de santé général comparées à des plantes moins tolérantes ; la pente de la courbe tracée entre leur charge en pathogènes et leur santé sera donc plus faible (Medzhitov et al., 2012; Schneider and Ayres, 2008) (Figure 13).

Ce genre de réponse a été observé chez différentes souches de *Drosophila melanogaster* infectées avec une même souche identique de *Pseudomonas aeruginosa* : certaines des lignées infectées présentaient une quantité élevée de bactéries sans pour autant subir une mortalité aussi élevée que d'autres, et ce sans investir dans une réponse immunitaire coûteuse (Corby-Harris et al., 2007).

Les mécanismes entrant en jeu dans la tolérance sont encore mal connus et n'ont pas encore été décrits comme existant chez l'abeille. Cependant, chez la drosophile, il existe des

variations parfois très marquées entre lignées génétiques infectées par la même maladie, laissant penser que la tolérance pourrait être une stratégie développée aussi chez l'abeille en réponse à des pathogènes et des parasites. Des colonies ont été considérées comme tolérantes à *Varroa* car elle étaient toujours infestées tout en présentant des mortalités moindres ; cependant il a été observé dans certaines des comportements hygiéniques permettant de réduire le succès reproductif des acariens (Barbara Locke et al., 2012), tel que le VSH, pour *Varroa*-sensitive hygiene, où les abeilles désoperculent et éliminent le couvain infesté, bloquant la reproduction (Harbo and Harris, 2005). Il a été montré qu'elles pourraient désoperculer spécifiquement les cellules où le *Varroa* est effectivement en train de se reproduire (Ibrahim and Spivak, 2006). Ceci s'apparente plutôt à un caractère d'immunité sociale et donc à une résistance de la colonie.

La tolérance pourrait être une réponse clé aux stress chez l'abeille domestique. En effet, nous avons pu voir que ses réponses aux infections virales sont peu spécifiques, et nous allons voir dans le chapitre suivant ce qu'il en est pour les réponses aux pesticides. Ces derniers, comme il sera ensuite démontré, sont déjà suspectés d'aggraver certaines maladies des abeilles en ayant un effet sur le système immunitaire (Di Prisco et al., 2013; Sánchez-Bayo et al., 2016). Ainsi la tolérance, par sa demande moindre en investissement de l'individu dans les réponses de résistance immunitaire, pourrait permettre à l'abeille de contourner ce problème, en continuant à tempérer les effets des stress.

6) Les pesticides

Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, la production et l'usage des pesticides sont devenus de plus en plus répandus et de plus en plus intensifs, en France comme dans les autres pays (Stephenson, 2003). En facilitant l'agriculture intensive, et en diminuant de plus en plus les impacts des organismes parasites et pathogènes aux cultures, ils ont permis d'augmenter la productivité.

Le terme « pesticide » englobe différents produits permettant de se débarrasser de nuisibles (« pests » en anglais), qu'ils soient végétaux, animaux ou appartenant à d'autres ordres. Ils contiennent notamment les herbicides (plantes), les insecticides (insectes), les acaricides (acariens), les fongicides (champignons), rodenticides (rongeurs), etc...

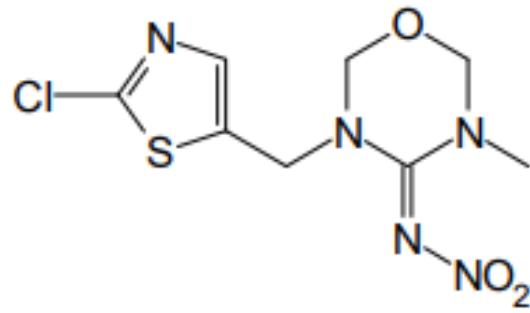
Les insecticides sont donc développés pour éliminer spécifiquement les insectes, qu'ils soient nuisibles ou parasites directement pour l'homme, comme les moustiques, ou ravageurs de cultures, tels que les pyrales, par exemple. Sur la seule année 2014, les insecticides, toutes catégories confondues, ont été utilisés en France à raison de 3483,9 tonnes de substance active (FAOSTATS, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>, consulté le 24/07/17).

Les insecticides sont souvent incriminés comme une des causes du déclin des abeilles (Goulson et al., 2015; S. G. Potts et al., 2010a; Sánchez-Bayo et al., 2016; Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Parmi eux, les néonicotinoïdes sont de plus en plus souvent blâmés, notamment car leur utilisation semble avoir coïncidé avec l'émergence de phénomènes récurrents de pertes de colonies dans les années 2000. En effet, ils ont commencé à être commercialisés à grand échelle dans le monde à partir des années 1990 (première commercialisation de l'imidaclopride au Japon en 1991, démocratisation entre le milieu des années 1990 et le début des années 2000, utilisation en constante augmentation depuis (van der Sluijs et al., 2013)).

a) Les néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes sont une famille d'inhibiteurs des récepteurs acétylcholinergiques. Leur mode d'action est de se fixer avec une grande affinité sur les récepteurs à l'acétylcholine, impliqués dans le signal neuronal. Les molécules de néonicotinoïdes ainsi fixées aux récepteurs vont empêcher la fixation du neurotransmetteur effectif qu'est l'acétylcholine, bloquant le signal et surexcitant les cellules neuronales sur lesquels elles sont fixées, entraînant une paralysie et à plus ou moins long terme la mort (Nauen et al., 2003, Tomiwasa et al., 2003).

Les néonicotinoïdes représentaient en 2010 plus de 25% du marché des insecticides dans le monde (van der Sluijs et al., 2013). On leur attribue de plus en plus souvent de fortes mortalités chez les abeilles et des effets sublétaux aussi bien en laboratoire que sur le terrain, seuls (Aufauvre et al., 2012; Henry et al., 2012; Tison et al., 2016) ou en présence d'autres



thiamethoxam

Figure 14 : Structure chimique du thiaméthoxam (FAO)

facteurs de stress (Alaux et al., 2010a; Doublet et al., 2015a; Nazzi and Pennacchio, 2014; Vidau et al., 2011) ou la reine (Dussaubat et al., 2016).

Sept principales molécules de la classe des néonicotinoïdes sont utilisées dans le monde. Elles se répartissent en deux groupes selon la nature d'un de leurs substituants.

Les cyanoguanidines possèdent un groupement cyano- (CN) sur l'un de leurs cycles, et les deux néonicotinoïdes qui contiennent ce groupement, le thiaclopride et l'acétamipride, sont considérés comme les néonicotinoïdes les moins toxiques pour les abeilles (DL50 thiaclopride orale 17,32 µg/abeille, acétamipride 14,53 µg/abeille, contre thiaméthoxam 0.005 µg/abeille (=5ng/abeille)) (Efsa, 2013; Laurino et al., 2011; AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017). La DL50 représente la dose à laquelle 50% de la population testée meurt, généralement observé 48h après exposition.

Les nitroguanidines possèdent eux un groupement nitro- (NO₂). Ils regroupent tous les autres néonicotinoïdes, à savoir : l'imidaclopride, le nitenpyram, le dinotefuran, le thiaméthoxam et la clothianidine. La clothianidine, le nitenpyram et le dinotefuran ne sont pas autorisés en France (<https://ephy.anses.fr/>, consulté le 24/07/2017)(Blacquiere et al., 2012; van der Sluijs et al., 2013).

Seront développés dans les prochains paragraphes les caractéristiques du thiaméthoxam, mais également de la clothianidine, son métabolite principal dans les plantes et les insectes, y compris les abeilles (Nauen et al., 2003). Le thiaméthoxam (figure 14) a été choisi après les observations faites par l'ANSES sur des abeilles présentant des symptômes proches de paralysie près de champs traités au Cruiser® (ANSES, 2012), et surtout compte tenu de son utilisation extensive en enrobage de semences, dont celles de colza, très attractif pour les abeilles (Simon-Delso et al., 2015). La clothianidine est également décrite plus en détail, car même si le potentiel de dégradation du thiaméthoxam en sa molécule fille est connu, il est peu étudié et il est possible, par la métabolisation, que l'on observe peut-être les effets de la clothianidine plutôt que les effets du thiaméthoxam lorsqu'on expose les insectes au thiaméthoxam.

i) Le thiaméthoxam

Le thiaméthoxam est un des néonicotinoïdes les plus utilisés dans le monde à l'heure actuelle, en tant que pesticide vaporisé sur les cultures (commercialisé en France pour cet usage par Syngenta sous le nom d'Actara®), mais surtout en tant que pesticide systémique en enrobage de semences de maïs et de colza (Cruiser®) (Maienfisch et al., 2001; Nauen et al., 2003; van der Sluijs et al., 2013). Les molécules systémiques ont la particularité de pouvoir circuler dans le système vasculaire de la plante et ainsi de pouvoir migrer dans tous les tissus. Ainsi on peut retrouver du thiaméthoxam et d'autres néonicotinoïdes systémiques dans le nectar ou le pollen produit par la plante alors que seule la graine a été au départ enrobée avec le pesticide.

Le thiaméthoxam est également connu pour être métabolisé assez rapidement en clothianidine par les plantes et les insectes (Benzidane et al., 2010; Nauen et al., 2003). Il existe également 31 autres métabolites du thiaméthoxam, mais ils se retrouvent en quantité négligeable dans les organismes (Benzidane et al., 2010; Casida, 2011; FAO and Hamilton, n.d.; Maienfisch et al., 2001).

Le thiaméthoxam, bien qu'étant un néonicotinoïde, a un mode d'action légèrement différent (principalement de l'imidaclopride) et ne semble pas s'attacher de la même façon aux récepteurs, voire aux mêmes récepteurs, que les autres insecticides de la même famille (Maienfisch et al., 2001). Une partie de ses effets pourraient ainsi être imputés à la clothianidine, puisque la métabolisation est très rapide (Benzidane et al., 2010). Le thiaméthoxam possède une DL50 orale à 48h évaluée entre 4.41ng par abeille (Laurino et al., 2011) et 5ng par abeille (AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017).

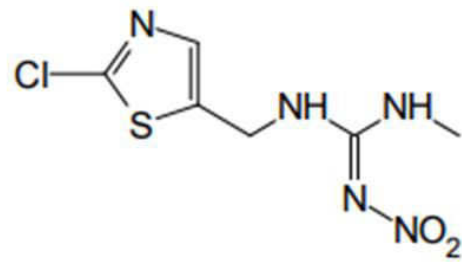
Plusieurs études ont établi qu'il existait des effets délétères du thiaméthoxam sur l'abeille domestique. Ainsi il a été observé une réduction significative de la mémoire olfactive d'ouvrières, ainsi qu'une détérioration des performances d'apprentissages (Y Aliouane et al., 2009). Ont également été observés des effets sublétaux sur les larves, qui prennent une couleur marron, et voient leur période de transformation en nymphe significativement retardée (Grillone et al., 2017). Une exposition continue à des doses sublétales a été

démontrée comme pouvant endommager le cerveau et l'appareil digestif d'abeilles africanisées (Catae et al., 2014; Oliveira et al., 2014). Les performances d'orientation de butineuses dans un labyrinthe complexe sont aussi affectées par le thiaméthoxam (Fourrier et al., 2009). Dans les colonies, de faibles doses de thiaméthoxam en exposition aiguë suffisent à affecter les vols de retour à la ruche (Henry et al., 2012b). Brièvement, des butineuses équipées de puces RFID ont été exposées à 1,34 ng de thiaméthoxam (dose environnementale) puis relâchées loin de leurs colonies. 10,2 à 31,6% de ces abeilles ont ensuite échoué à revenir à leur ruche. Cette étude conclut, en utilisant des modélisations, que la perte de ces butineuses pourrait impacter l'équilibre de la colonie, qui risquerait ainsi l'effondrement si les expositions étaient répétées.

Compte tenu des effets déjà connus du thiaméthoxam, et de son utilisation étendue, nous avons choisi d'étudier ses potentiels effets en interaction avec les deux virus précédemment cités, le DWV et le CBPV, dont la prévalence est elle aussi élevée.

ii) La clothianidine

La clothianidine (figure 15) est obtenue à partir du thiaméthoxam par clivage du composé oxadiazine (Casida, 2011)(figure 16). Cette métabolisation n'a cependant pas encore été étudiée en détail chez l'abeille domestique. La clothianidine est également commercialisée en tant qu'insecticide séparément du thiaméthoxam ; ce dernier peut être considéré comme une molécule précurseur plutôt que comme une molécule mère (Nauen et al., 2003). La clothianidine est commercialisée en France uniquement sous la forme de granules (<https://ephy.anses.fr/>, consulté le 24/07/2017). Elle est considérée comme étant légèrement plus toxique que le thiaméthoxam, possédant une DL50 orale à 48h entre 4 et 2.69 ng par abeille (Laurino et al., 2011) (AGRITOX, <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>, consulté le 24/07/2017).



CGA 322704 = clothianidine

Figure 15 : Structure chimique de la clothianidine (FAO)

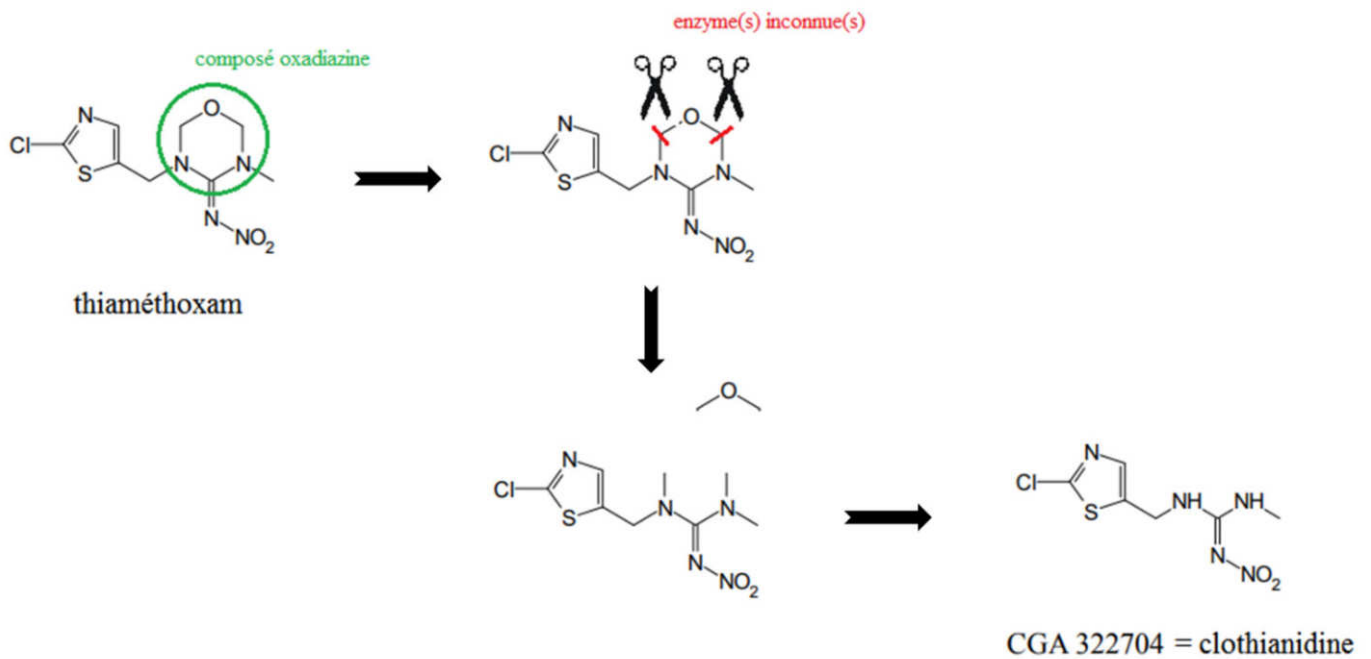


Figure 16 : Métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine.

La clothianidine a été démontrée comme ayant un impact négatif sur les réponses cellulaires de l'immunité des abeilles à de fortes concentrations (Brandt et al., 2016). Elle cause également une réduction significative de l'activité de butinage, et un allongement des durées de vol chez des abeilles exposées au minimum à 0,5 ng (Schneider et al., 2012). Di Prisco et al., 2013 ont notamment observé que la clothianidine, dès 3 ng/abeille, inhibait chez l'abeille un facteur immunitaire, empêchant les individus de contrôler les infections de DWV DWV, ce qui entraînait une augmentation de la réplication du virus chez les abeilles exposées.

b) Règlementation

Il existe plusieurs réglementations en France, dans l'Union Européenne, et dans le monde. Les néonicotinoïdes sont déjà depuis quelques années perçus dans le domaine de la recherche sur les pollinisateurs mais également de façon grandissante par l'opinion publique comme étant l'une des causes du déclin des abeilles. Pour cette raison plusieurs réglementations ont vu le jour ces dernières années.

En Europe, un moratoire a suspendu l'utilisation de trois néonicotinoïdes entre 2013 et 2015 : l'imidaclopride, le thiaméthoxam et la clothianidine. Cependant, ce moratoire ne concernait pas tous les usages de ces pesticides (uniquement concentré sur l'utilisation en tant que pesticide systémique en enrobage des semences). Aujourd'hui, en 2017, il n'est pas encore possible à si court terme d'évaluer le bénéfice de cette interdiction sur la santé des colonies d'abeilles (Blacquière and van der Steen, 2017).

En France, la réglementation prend en compte les risques pour les abeilles depuis 2003 avec un arrêté interdisant la pulvérisation d'insecticides en période de floraison :

« En vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs, les traitements réalisés au moyen d'insecticides et d'acaricides sont interdits durant toute la période de floraison, et pendant la période de production d'exsudats, quels que soient les produits et l'appareil applicateur utilisés, sur tous les peuplements forestiers et toutes les cultures visitées par ces insectes. » (Arrêté du 28 novembre 2003 relatif aux conditions d'utilisation des insecticides et acaricides à usage agricole en vue de protéger les abeilles et autres insectes pollinisateurs, article 2) (<https://www.legifrance.gouv.fr> consulté le 27/07/2017).

Il existe également depuis 2006 une « mention abeille » sur les pesticides, attribuée par l'Anses après expérimentations, qui permet aux substances possédant cette mention, jugées d'impact faible pour les pollinisateurs, de déroger au précédent arrêté (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/> consulté le 27/07/2018).

En parallèle, le gouvernement français, sur la base de nouveaux résultats obtenus par la recherche, et des recommandations notamment de l'Anses concernant l'impact des néonicotinoïdes sur les abeilles domestiques et sauvages et autres pollinisateurs, a décidé d'interdire totalement tout usage (sous réserves de dérogations) de pesticides néonicotinoïdes à partir du premier septembre 2018, amendement voté à l'assemblée nationale le 08 août 2016.

I. - La pulvérisation aérienne des produits phytopharmaceutiques est interdite.

En cas de danger sanitaire grave qui ne peut être maîtrisé par d'autres moyens, la pulvérisation aérienne de produits phytopharmaceutiques pour lutter contre ce danger peut être autorisée temporairement par arrêté conjoint des ministres chargés de l'environnement, de l'agriculture et de la santé.

II. - L'utilisation de produits phytopharmaceutiques contenant une ou des substances actives de la famille des néonicotinoïdes et de semences traitées avec ces produits est interdite à compter du 1er septembre 2018.

Des dérogations à l'interdiction mentionnée au premier alinéa du présent II peuvent être accordées jusqu'au 1er juillet 2020 par arrêté conjoint des ministres chargés de l'agriculture, de l'environnement et de la santé (Article L253-8 du Code rural et de la pêche maritime, <https://www.legifrance.gouv.fr>, consulté le 27/07/2017).

L'Anses est en outre l'organisme à présent chargé de délivrer les autorisations de mise sur le marché des produits sanitaires (AMM) depuis le 1^{er} juillet 2015.

c) Dans l'environnement

Lorsque les néonicotinoïdes sont appliqués en enrobage de semences ; seulement 1,6 à 20 % de substance active sera utilisée par la plante (van der Sluijs et al., 2013). Le reste se

retrouvera dans l'environnement. Leurs molécules, surtout l'acétamipride et le thiaméthoxam, étant facilement solubles dans l'eau, pourront être lessivées et contaminer les sols, s'étendre autour de la zone traitée et contaminer à terme les eaux de surfaces et les nappes phréatiques (Miranda et al., 2011; van der Sluijs et al., 2013). Ce lessivage sera d'intensité variable en fonction des types de sols, les néonicotinoïdes s'adsorbant préférentiellement aux sols contenant un fort taux de matières organiques (Selim et al., 2010). Le type d'utilisation des pesticides (enrobages, pulvérisation...) joue également un rôle ; en effet la présence de surfactants dans les préparations pour pulvérisation augmente la solubilité et la stabilité des composés dans l'eau et va donc augmenter leur potentiel de lessivage (Gupta et al., 2002). De plus, les néonicotinoïdes et leurs métabolites sont très persistants dans tous ces compartiments (sol, sédiments et eau). La clothianidine a par exemple une demi-vie dans le sol qui varie selon les estimations de 148 à 6900 jours (soit un peu plus de 18 ans)(van der Sluijs et al., 2013). Ces pesticides présentent donc un risque d'accumulation élevé dans les parcelles, dans les eaux de surface ou par adsorption aux sédiments , particulièrement dans le cas d'usages répétés (Haith, 2010).

Il est important de noter cette contamination de l'eau, puisque l'eau contaminée peut être puisée à nouveau par d'autres plantes (cultures suivantes sur la même parcelle, adventices si lessivage) et donc rendue à nouveau disponible pour les abeilles – ou même récoltée ou bue directement par elles (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012).

Par l'eau, la persistance dans le sol, ou par dérive des pulvérisations, des cultures non cibles ou des plantes non cultivées telle que des plantes adventices aux cultures ou des plantes sauvages poussant non loin des champs, peuvent être contaminées par des quantités plus ou moins fortes de pesticides (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012). Il a été démontré que les abeilles ont tendance à plutôt butiner des plantes sauvages ou adventices que des plantes cultivées (Long and Krupke, 2016). Ainsi, 97 % des néonicotinoïdes ramenés à la ruche par les abeilles dans le pollen ou le nectar ne provenait pas de plantes cultivées et traitées mais de plantes sauvages (Botías et al., 2015). Cela augmente les sources de contamination et rallonge les fenêtres d'exposition possibles par rapport à ce qui est généralement calculé par les agriculteurs et apiculteurs. Il y a donc un risque de sous-estimation de l'exposition aux néonicotinoïdes.

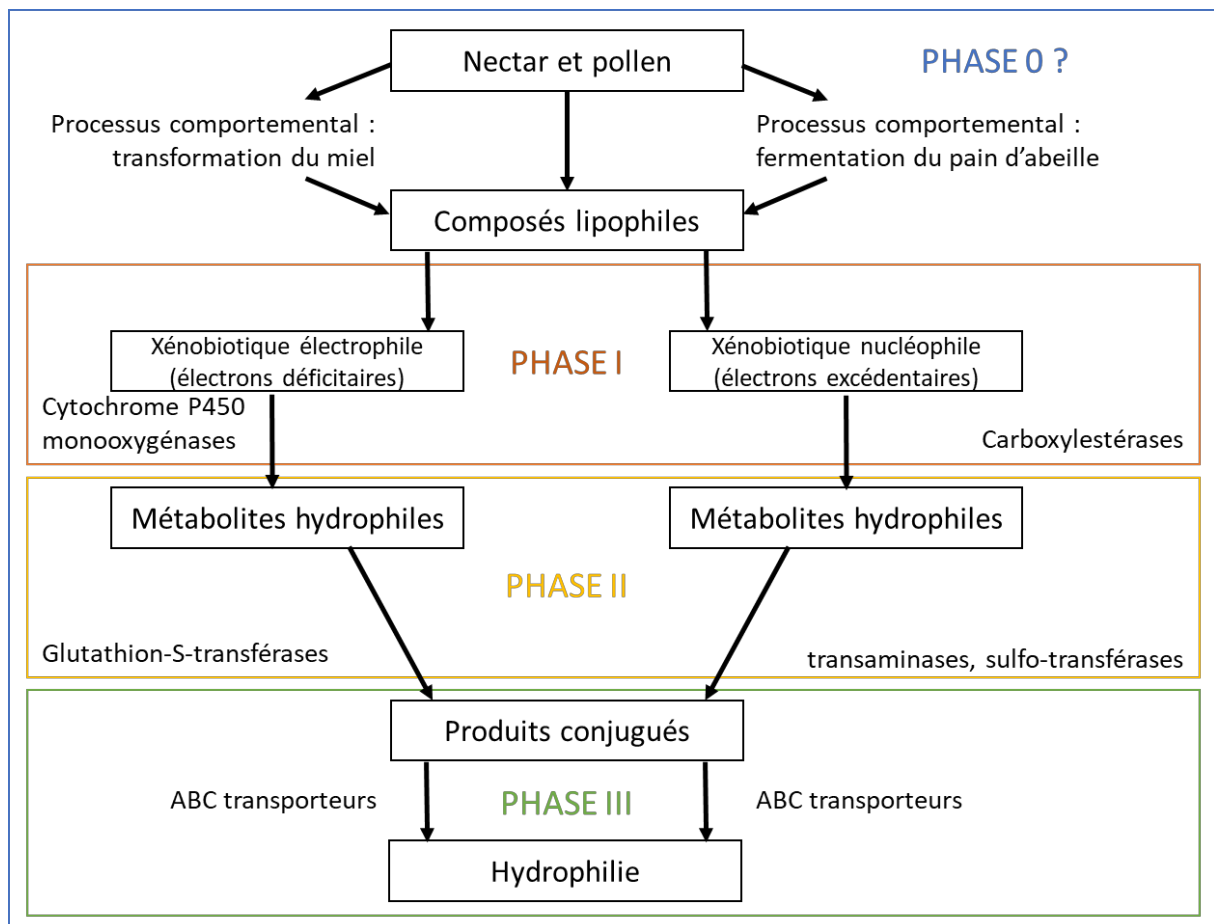


Figure 17 : Les différentes phases de détoxification des xénobiotiques chez l'abeille domestique (d'après Berenbaum and Johnson 2015).

d) La détoxification chez l'abeille

La détoxification des xénobiotiques, chez tous les organismes, se déroule généralement en trois phases successives : la phase 1 de fonctionnalisation du xénobiotique, la phase 2 de conjugaison, et enfin la phase 3 d'excrétion (Berenbaum and Johnson, 2015).

La phase 1 repose sur une altération enzymatique de la structure du xénobiotique qui le rendra incapable d'interagir avec les récepteurs qu'il cible ; elle est effectuée principalement par une famille de complexes protéiques appelés les cytochromes P450 (CYP), qui regroupe elle-même plusieurs sous familles aux fonctions et cibles différentes, et des carboxylestérases (CCE).

La phase 2 permet la conjugaison du xénobiotique avec une molécule qui permettra sa solubilisation et son excrétion ultérieure. Cette conjugaison, dans le cadre de la détoxification, se fait le plus souvent avec du glutathion, un tri-peptide présent en grande quantité dans les cellules, par l'intermédiaire de glutathionne-S-transférases (GST). Les GST peuvent également être considérées comme enzymes de la phase 1, car elles peuvent effectuer les conjugaisons directement et ainsi réduire le potentiel toxique du xénobiotique. Plusieurs autres enzymes peuvent effectuer des conjugaisons, telles que les glycosyltransférases, les phosphotransférases, les sulfotransférases, aminotransférases et glycosidases (Berenbaum and Johnson, 2015).

La phase 3 met en jeu le transport des molécules obtenues après conjugaison à la phase 2 en dehors des cellules, pour être ensuite excrétées hors de l'organisme. La plupart de ces transports sont effectués par les « multidrug resistance proteins » (protéine de résistance multiple) ou ATP-binding cassettes. Ces protéines hydrolysent l'ATP afin de pouvoir transporter des conjugaisons ou des molécules hydrophobes à travers les membranes lipidiques des cellules (Berenbaum and Johnson, 2015).

Tout comme pour les gènes codant pour des facteurs de l'immunité, les abeilles domestiques possèdent significativement moins de gènes associés à la détoxification des xénobiotiques que d'autres espèces d'insectes solitaires. Cela s'observe notamment pour les familles connues codant pour les cytochromes P450 (environ 46 gènes chez *A. mellifera* contre 85 chez *D. melanogaster* et 106 chez *An. gambiae*), les CCE (24 contre 35 et 51,

respectivement). Les abeilles possèdent environ la moitié des gènes codant pour des GST chez les autres insectes modèles. Cependant ces pertes de gènes ne sont pas régulières, et on observe chez l'abeille l'absence de certaines familles (CYP4) (Berenbaum and Johnson, 2015), mais également une augmentation de la proportion d'autres, notamment une plus grande proportion relative de CYP6 et CYP9 (famille CYP3) et des σ GST (Claudianos et al., 2006). Le CYP3A4, que l'on retrouve chez les mammifères, a été observé comme étant très efficace pour convertir le thiaméthoxam en clothianidine (Casida, 2011), les équivalents chez l'abeille se trouveraient dans les familles CYP6 et CYP9 (Claudianos et al., 2006). Ces deux sous-familles ont été observées comme entrant en jeu dans la résistance aux pyréthroïdes, DDT et néonicotinoïdes chez d'autres insectes (Daborn, 2002; Nikou et al., 2003).

Le faible nombre relatif de gènes de détoxification chez les abeilles suggère plus grande sensibilité aux pesticides par rapport à d'autres insectes. Cependant, il a été décrit que les abeilles n'étaient en fait pas significativement plus sensibles à la plupart d'entre eux ; voire parfois moins (Hardstone and Scott, 2010). Les abeilles pourraient paraître plus sensibles aux pesticides parce qu'elles sont en fait exposées à des pesticides multiples, les rendant vulnérables aux interactions entre xénobiotiques (Berenbaum and Johnson, 2015; Claudianos et al., 2006). Par exemple, l'exposition grandissante à des fongicides, qui s'accumulent dans les ruches (principalement les cires car ils sont très lipophiles), peut entraîner une diminution de la résistance à des insecticides par inhibition des cytochromes P450. Une grande partie des fongicides utilisés sont en effet des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, qui inhibent les P450 des champignons (Berenbaum and Johnson, 2015; Iwasa et al., 2004; Johnson et al., 2013).

Il est intéressant de noter que l'alimentation, tout comme pour l'immunité, joue un rôle dans la détoxification. Tout d'abord parce que la détoxification a un coût énergétique que l'abeille devra compenser, ce qu'elle ne pourra pas faire, ou mal, si son alimentation n'est pas optimale (Berenbaum and Johnson, 2015). Il a été également observé que cette alimentation, en qualité comme en quantité, peut influencer sur la transcription de certains gènes liés à la détoxification. En effet, la présence dans le miel et surtout le pollen de certaines molécules, notamment l'acide para-coumarique (« p-coumaric acid »), augmente la transcription de gènes provenant de toutes les classes de détoxification, ainsi que certains peptides anti-microbiens (Mao et al., 2013). Il a ainsi été observé que des extraits de miel augmentaient la transcription de gènes des sous-familles CYP6AS et CYP9Q, et que de l'acide para-coumarique ajouté à du

sucres augmentait notamment le métabolisme de l'acaricide coumaphos de 60% dans l'intestin des abeilles (Mao et al., 2013).

L'alimentation chez les abeilles peut également contribuer à une certaine détoxification sociale. Ainsi, le taux de xénobiotiques dans la nourriture peut être diminué par dilution, après le mélange des nectars pour faire du miel ou celui des pollens pour faire du pain d'abeille. De plus, ces processus de transformations eux-mêmes pourraient diminuer le taux de toxines présents dans le produit fini par rapport au produit initial. Ceci se ferait principalement à cause des conditions physiques de la colonie pour le miel (température, pH), et par dégradation fongique pour le pain d'abeille. Le pain d'abeille contient également nombre de bactéries commensales, ou symbiotiques de la ruche, qui sont reconnues comme bénéfiques (Anderson et al., 2011; Berenbaum and Johnson, 2015; Mao et al., 2013). Cette « détoxification sociale » ne s'arrête pas là : les abeilles possédant également des comportements spécifiques permettant de diminuer leur exposition : les butineuses sont ainsi capables de détecter et d'éviter certaines toxines, voire de ne plus retourner à une source si elles ont subi des effets indésirables. Les nourrices pourraient également « sceller » les alvéoles où elles détectent trop de fongicides (vanEngelsdorp et al., 2009). Cependant certains composés ne sont pas détectables et certains peuvent également être attractifs, notamment les néonicotinoïdes (Kessler et al., 2015).

Tout ceci souligne encore une fois l'importance de la nutrition pour les abeilles. Il souligne également le besoin de réexaminer les résultats obtenus en laboratoire (où les abeilles sont rarement nourries de pollen et de miel) et d'étendre les expérimentations au champ (Mao et al., 2013).

e) L'effet des pesticides sur l'immunité des abeilles

L'une des pistes possibles pour étudier une interaction potentielle entre le thiaméthoxam et les virus que nous avons choisis comme modèles, le DWV et le CBPV, est l'impact du pesticide sur les défenses immunitaires des abeilles. Il a été fréquemment rapporté qu'une exposition aux pesticides pouvait avoir un effet direct sur certains composants du système immunitaire, voire sur les défenses physiques ou les comportements empêchant les contagions chez les insectes en général et chez les abeilles en particulier (Berenbaum and Johnson, 2015;

Yu et al., 1984). Ainsi, les pesticides peuvent avoir un effet sur les réponses immunitaires humorales des insectes : la toxine *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) induit une augmentation de la production d'AMP chez plusieurs espèces (James and Xu, 2012). Ils peuvent également impacter les réponses cellulaires : les taux d'hémocytes sont connus pour augmenter suivant les réponses non seulement immunitaires mais également aux xénobiotiques. Certains organophosphates entraînent des variations de proportions entre les différents types

d'hémocytes, tandis que des cyclodienes et des organochlorés peuvent faire diminuer le taux d'encapsulation chez *D. melanogaster* (James and Xu, 2012). Finalement, certains pesticides peuvent avoir des effets sur l'immunité sociale : l'imidaclopride, en impactant le comportement de toilettage chez les termites, permet une augmentation des infections de ces organismes par un champignon entomopathogène (Boucias, 1996).

Spécifiquement chez l'abeille domestique, il existe des effets au niveau de l'immunité individuelle, puisque l'on sait qu'une exposition chronique au fipronil ou à l'imidaclopride diminue la transcription de gènes reliés à l'immunité, entraînant une hausse de la mortalité chez des abeilles préalablement infectées par *Nosema sp.* (Aufauvre et al., 2014). De plus, la clothianidine inhibe chez l'abeille un facteur de la voie NFκB, empêchant les individus de contrôler les infections virales, ce qui induit une augmentation de la réplication chez les abeilles exposées (Di Prisco et al., 2013). Il a aussi été observé une corrélation significative entre la présence de fongicides dans les ruches et le taux de virus dans les colonies (Simon-Delso et al., 2014), ainsi qu'une corrélation positive entre les traitements aux néonicotinoïdes, la présence de *Varroa* et celle de virus dans les ruches (Alburaki et al., 2015). Toutefois, on observe également des effets sur l'immunité sociale puisque l'imidaclopride est aussi connu pour diminuer l'activité glucose-oxydase, impliquée dans la production d'antiseptique H₂O₂, d'abeilles infectées par *N. ceranae* (Alaux et al., 2010a).

7) Des interactions ?

Tous les facteurs, virus, pesticides, et autres décrits précédemment sont présents dans l'environnement de l'abeille domestique. Ces stress peuvent s'exercer de façon simultanée ou successive. Le fait que les abeilles vivent en colonies de plusieurs milliers d'individus confinés dans une ruche est à la fois un moyen de protection contre les prédateurs (protection

mécanique de la ruche, présence de gardiennes) et les pathogènes (immunité sociale), mais également un endroit où peuvent se concentrer les facteurs de stress, au plus près du développement des individus (Evans and Spivak, 2010; Poquet et al., 2016). La concentration forte des abeilles au sein d'un espace réduit, de même que la socialité, entraîne une transmission facilitée des pathogènes et parasites, grâce notamment au comportement de trophallaxie. La ruche ne concentre pas que des individus, mais également des réserves de nourriture ramenées par les butineuses de plusieurs kilomètres aux alentours, et qui peuvent contenir d'autres pathogènes, mais également des pesticides de tous types (Poquet et al., 2016). Les pesticides, selon leur constitution chimique, peuvent être retrouvés de façon persistante dans les pollens, le miel et le pain d'abeille stocké, mais aussi dans les cires et autres produits de la ruche ; en effet, la plupart des pesticides ont tendance à s'accumuler dans les substances contenant un fort taux de lipides (Chauzat et al., 2011 ; Mullin et al., 2010). La concentration de pathogènes et de pesticides, est ainsi possible dans une même ruche, et les nombreuses interactions résultantes peuvent être préjudiciables à la santé des individus ou de la colonie tout entière.

Comme son nom l'indique, une interaction est une réaction réciproque de deux (voire plus) phénomènes l'un sur l'autre. Il existe trois types d'interaction (Doublet et al., 2015a; González-Varo et al., 2013; Holmstrup et al., 2010) (Doublet et al., 2014 ; Holmstrup et al., 2010):

- Une interaction antagoniste va résulter d'un effet négatif d'un premier facteur sur l'effet d'un second facteur
- Une interaction additive correspond au cumul des effets de chacun des facteurs
- Enfin, une interaction est synergique lorsque la résultante de l'application des effets de tous les facteurs est significativement plus forte que l'addition des effets individuels de ces facteurs.

Chez l'abeille, plusieurs interactions ont déjà été étudiées et démontrées entre certains facteurs de stress.

Les pesticides eux-mêmes peuvent interagir entre eux. Johnson et al., 2013 ont observé une augmentation synergique de la toxicité de l'acaricide tau-fluvalinate, utilisé dans les traitements contre *Varroa*, sur des abeilles ayant préalablement été exposées à divers fongicides. Ils avaient préalablement démontré une autre interaction synergique entre deux

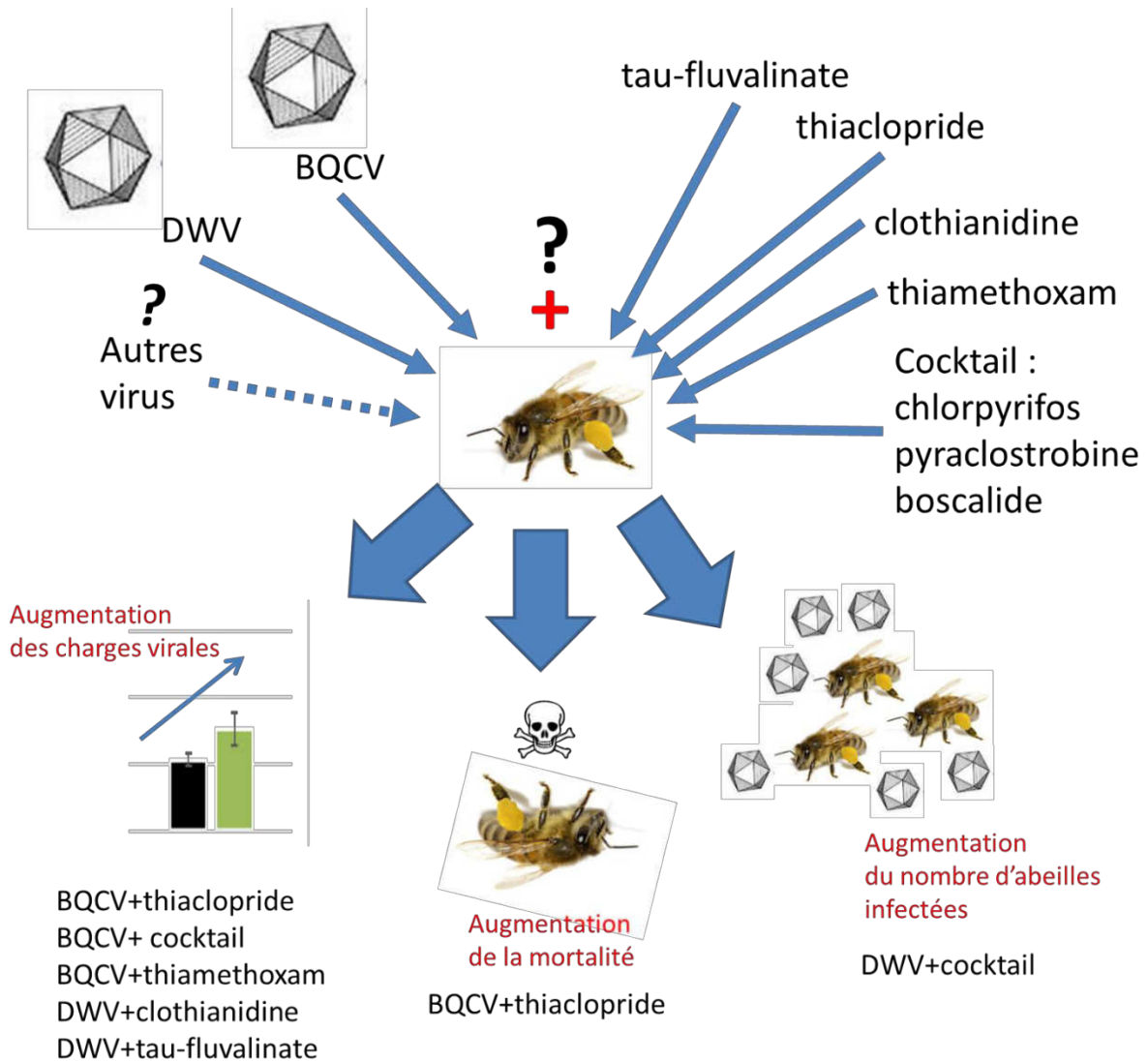


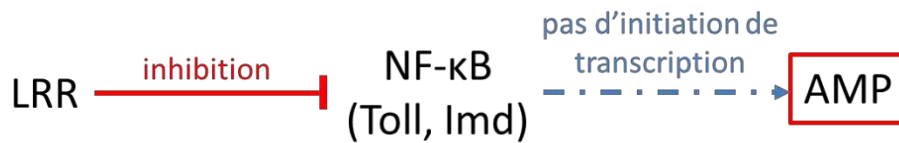
Figure 18 : Résumé des effets observés des interactions virus-pesticides déjà observées chez l'abeille domestique (d'après Alburaki et al., 2015; Degrandi-hoffman et al., 2013; Doublet et al., 2015; B Locke et al., 2012). Des interactions n'ont été observées que pour BQCV et DWV à l'heure actuelle.

acaricides, auxquels la colonie peut être simultanément exposée à cause de la stabilité de ces composants dans la ruche (Johnson et al., 2009a). Des interactions entre pathogènes et/ou parasites ont aussi été observées. En effet, le *Varroa* est considéré comme vecteur de plusieurs virus de l'abeille, dont le DWV, et 3 virus proches, l'ABPV, l'IAPV, et le KBV. Il a été démontré notamment une augmentation des charges en DWV sur des abeilles infestées par *Varroa*, entraînant par un effet synergique de la co-infection *Varroa/DWV* une surmortalité des abeilles pouvant mener à l'effondrement de la colonie (Nazzi et al., 2012). De même les charges virales en DWV ou en virus du complexe AKI sont corrélées avec les charges en *Varroa destructor* des colonies (Francis et al., 2013).

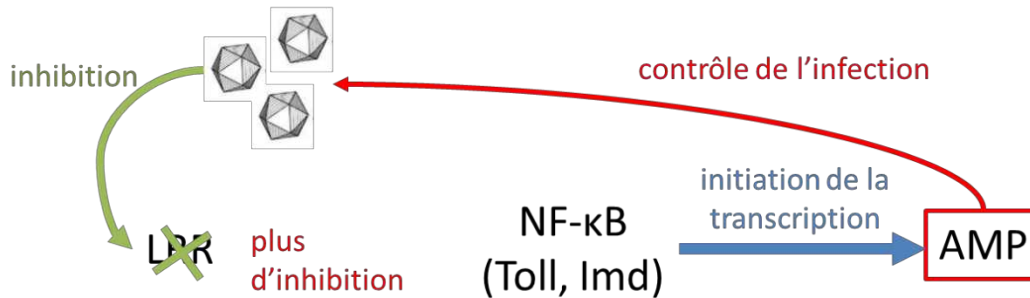
Par ailleurs, les pesticides et pathogènes peuvent interagir. Ainsi, une hausse de la mortalité des abeilles infectées par *Nosema ceranae* ou *spp.* a été observée après exposition de ces abeilles à des doses variables d'imidaclopride (Alaux et al., 2010), ou à des doses sublétales de fipronil et de thiaclopride (néonicotinoïde) (Vidau et al., 2011). Il a été observé que *Nosema spp.* interagit de façon synergique sur la mortalité des abeilles lorsqu'il est associé à une exposition au fipronil (phénylpyrazole)(Aufauvre et al., 2012). Une augmentation de la proportion d'abeilles infectées par *Nosema spp.* a également été démontrée, lorsque ces abeilles proviennent de cadres de couvain à fort taux de résidus de pesticides; ces abeilles étaient également infectées plus précocement par la microsporidie que lorsque les abeilles provenaient de cadres non contaminés (Wu et al., 2012). Enfin, il a été observé que de faibles doses d'imidaclopride augmentent les infections à *N. ceranae* dans les ruches exposées (Pettis et al., 2012a).

Enfin, les pesticides interagissent aussi avec les virus de l'abeille domestique (figure 18). Ainsi le BQCV se multiplie significativement plus dans des abeilles nourries avec un pollen contenant un cocktail de pesticides (chlorpyrifos (insecticide) + boscalide (fongicide) + pyraclostrobine (fongicide)) ; les mêmes auteurs ont également observé un taux d'infection au DWV plus élevé chez les larves de reines élevées dans des ruches contaminées aux pesticides (DeGrandi-Hoffman et al., 2013). Le BQCV, lorsqu'il est associé au thiaclopride, se multiplie significativement plus et provoque une augmentation synergique de la mortalité chez les larves d'abeille et n'a pas montré d'effet chez les adultes)(Doublet et al., 2015a). Une hausse des taux de DWV chez les abeilles a également été observée juste après un traitement au tau-

A: conditions sans stress



B: infection au DWV



C: infection LRR au DWV et exposition à la clothianidine

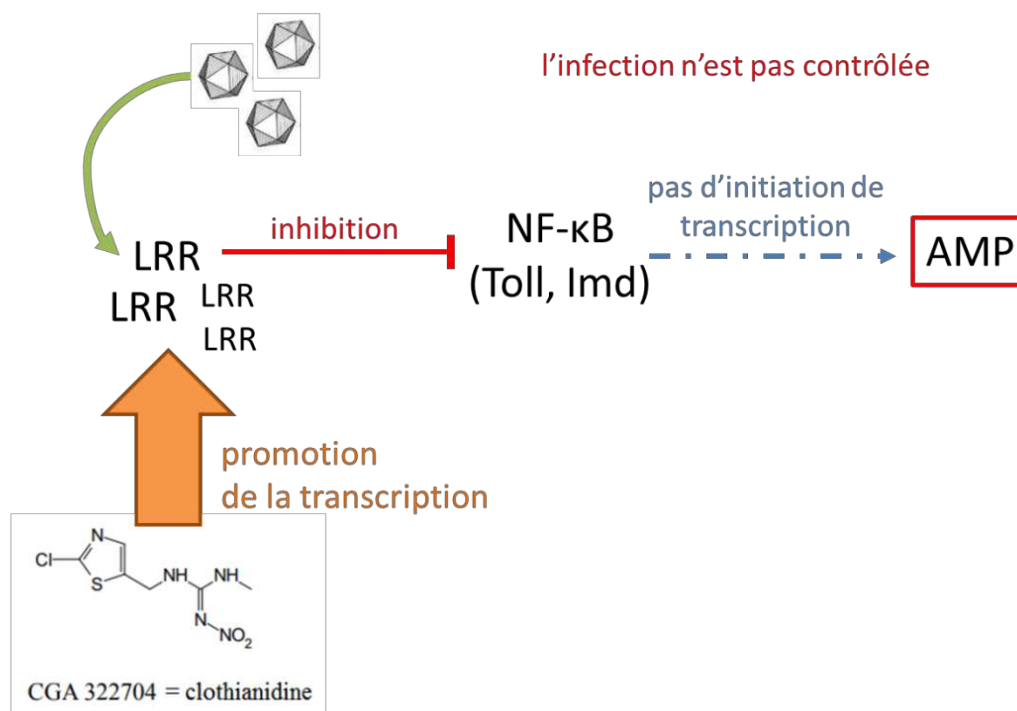


Figure 19: Modulation de la réponse des abeilles à une infection au DWV par la clothianidine (d'après Di Prisco et al., 2013).

A : conditions sans stress, B : infection au DWV, C : co-exposition clothianidine et DWV

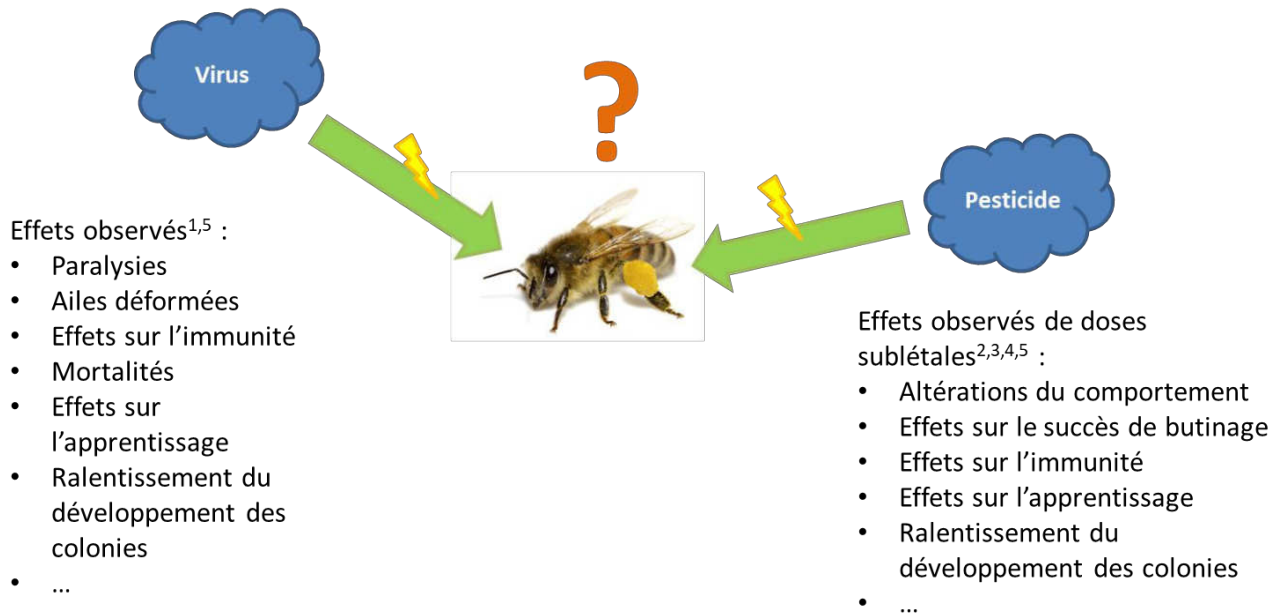
fluvalinate (traitement anti-*Varroa*) (B Locke et al., 2012). Sur le terrain, des charges en

Enfin, (Di Prisco et al., 2013) lors d'une étude précédemment citée, ont observé un effet de la clothianidine sur la régulation d'une infection expérimentale (par injection) par le DWV par les abeilles. En effet, la clothianidine entraîne une surproduction d'un facteur LRR (Leucine Rich Repeat), facteur qui en temps normal inhibe la voie NF- κ B, lorsqu'il n'y a pas d'infection. La production de ce facteur est régulée négativement en présence de pathogènes tels que des virus ou bactéries, ce qui va enclencher la voie NF- κ B, et entraîner par cascade une production d'AMPs. La surproduction de LRR causée par la clothianidine va donc entraîner une forte inhibition de la voie NF- κ B (dont celle de l'effecteur dorsal-1a) ce qui va empêcher l'abeille de contrôler l'infection en DWV, dont les charges sont ensuite observées comme significativement plus élevées que dans des abeilles infectées sans exposition à la clothianidine (figure 18).

Cependant, aucune étude n'a encore pu définir une interaction entre des stress spécifiques comme pouvant être la cause de l'affaiblissement des colonies d'abeilles. Ceci s'explique par le fait que les colonies vivent selon un équilibre fragile, qui peut être plus ou moins affecté en fonction de tous les facteurs, positifs ou négatifs, pesant sur le développement et les productions de la colonie. En effet, l'état de santé de la colonie peut accentuer significativement les effets négatifs de n'importe quel stress supplémentaire (Nazzi and Pennacchio, 2014). Ainsi il existe des niveaux et des seuils de stress critiques spécifiques à chaque colonie. Pour chacune d'entre elles, si elles sont proches d'un de ces seuils, une petite différence dans tel ou tel stress, ou l'apparition ou la disparition d'un nouveau stress, pourra détruire l'équilibre et déterminera l'évolution de la colonie vers un effondrement ou la persistance (Bryden et al., 2013).

Les travaux présentés dans cette thèse se focalisent sur les interactions potentielles entre virus et pesticide. J'ai pour cela choisi un modèle pesticide, le thiaméthoxam, et deux modèles viraux (figure 20).

Deux axes seront développés, un pour chacun de ces virus.



¹Aubert *et al*, 2008, ²Henry *et al* 2015, ³Suchail *et al*, 2001, ⁴Doublet *et al* 2014, Sanchez-Bayo 2016

Figure 20 : Résumé des effets de chaque protagoniste sur l'abeille domestique et question : que se passe-t-il quand l'abeille est confrontée aux deux simultanément ?

Tout d'abord un axe portant sur des expériences en laboratoire avec le modèle CBPV. Dans ce premier chapitre, j'ai voulu répondre à plusieurs questions. Tout d'abord, je me suis demandé ce qu'il advenait du thiaméthoxam dans les abeilles lors d'une exposition chronique à une dose sublétales, et j'ai déterminé pour y répondre une cinétique de métabolisation. J'ai ensuite voulu savoir s'il était possible de transmettre le CBPV expérimentalement aux abeilles en s'affranchissant de l'injection et du stress qu'elle cause. J'ai pour ceci développé une méthode de transmission par contact standardisée, en utilisant la capacité connue du CBPV à se transmettre de cette façon, et des abeilles préalablement injectées avec le virus comme inoculum. Finalement, j'ai utilisé les résultats obtenus pour déterminer s'il existait une interaction entre mon virus et mon pesticide modèles, et j'ai donc effectué des expériences de co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam à plusieurs doses, de sublétales à la DL50 proposée par la littérature. Ces expériences m'ont permis d'étudier l'effet de chacun des facteurs et de leur co-exposition sur les mortalités, les charges virales en CBPV, la consommation de sirop, et enfin la transcription de certains gènes liés à l'immunité ou à la détoxification.

Dans un deuxième axe, j'ai transporté ces études de co-expositions à l'extérieur, dans les colonies, et j'ai pour cela étudié le DWV dont la prévalence est déjà élevée dans les ruchers en temps normal. J'en ai profité pour tester si des doses sublétales de thiaméthoxam pouvaient avoir un effet significatif sur des charges virales naturelles en DWV, sur des abeilles au sein de leur colonie, comme il avait été observé par (Di Prisco et al., 2013) en cage avec la clothianidine. Afin de mettre en lumière d'éventuels effets comportementaux inobservables en laboratoire, j'ai utilisé des compteurs optiques mis au point par l'INRA pour suivre les entrées et sorties des abeilles tout au long de leur vie. Lors de cette expérience j'ai donc observé les effets potentiels des interactions entre le DWV, transmis par voie orale ou par injection, et le thiaméthoxam à des doses sublétales environnementales, sur différents traits de vie mais aussi sur la mortalité, les charges virales en DWV et autres virus potentiellement présents, et enfin encore une fois la transcription de certains gènes liés à l'immunité ou à la détoxification.

Questions de recherche et objectifs de la thèse

Elucider le rôle des interactions virus-pesticide dans le déclin des abeilles domestiques est un enjeu important dans un contexte de pertes élevées de colonies, d'émergence ou de réémergence de maladies et d'utilisation de nouvelles molécules insecticides. Cette thèse a pour objectif d'approfondir les connaissances encore parcellaires sur ces interactions en utilisant comme modèles deux virus (le CBPV et le DWV) et un pesticide de la famille des néonicotinoïdes (le thiaméthoxam).

Ces combinaisons de stress ont été choisies en raison de leur potentiel d'occurrence et d'impact significatif sur la santé des colonies d'abeilles domestiques. Les infections par le DWV comme le CBPV sont fréquentes et elles s'accompagnent parfois de signes cliniques clairement décrits (par exemple ailes déformées et abeilles tremblantes, respectivement) voire d'affaiblissements ou encore de mortalités de colonies (plus particulièrement pour le DWV). Toutefois, ces infections virales peuvent être aussi inapparentes et les mécanismes d'apparition des troubles sur la santé de l'abeille restent encore méconnus. Enfin, ces deux virus sont très différents non seulement sur le plan génétique et structurel mais aussi sur leur mode de transmission (le CBPV est essentiellement transmis par contact alors que le DWV est principalement transmis par l'acarien *Varroa destructor*).

Les études sur l'impact du thiaméthoxam (ou de son métabolite la clothianidine) sur la santé des abeilles sont nombreuses et ont fait l'objet de controverses (Hoppe et al., 2015; Pilling et al., 2013). Les conclusions différentes de certaines études pourraient être associées à la méconnaissance des mécanismes de métabolisation du pesticide chez l'abeille. Ces mécanismes eux-mêmes pourraient être sous la dépendance d'interactions avec d'autres facteurs impactant la santé des colonies d'abeilles, notamment des virus. Peu d'interactions de ce type ont déjà été testées. Les interactions citées dans l'introduction générale de ce manuscrit sont pour la plupart observées après exposition, d'abeilles naturellement infectées à un pesticide. Ces conditions expérimentales difficilement maîtrisables (notamment la charge

virale, non contrôlée) impactent la reproductibilité des résultats et limitent les conclusions sur les mécanismes d'interaction.

Afin d'effectuer des expérimentations avec une répétabilité accrue, des études de co-exposition ont été réalisées avec des abeilles saines, injectées avec un inoculum viral (exemple des travaux de Di Prisco et al., 2013 et de Doublet et al., 2015). Bien que la voie naturelle et principale de transmission du DWV par *Varroa destructor* s'effectue aussi par le percement de la cuticule (lorsque l'acarien se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille), il a notamment été observé qu'un simple percement de la cuticule sans injection avait un effet spécifique sur le système immunitaire de l'abeille (Alaux et al., 2014; Evans et al., 2006; Siede et al., 2012). L'inoculation virale par injection implique donc des manipulations pouvant générer des stress et en conséquence des biais expérimentaux.

Ces connaissances limitées sur les mécanismes d'action des facteurs de stress agissant sur l'abeille ne sont pas les seules. Concernant l'effet des pesticides, il n'existe à notre connaissance aucune étude déterminant la cinétique de métabolisation du thiaméthoxam dans les abeilles. De plus, les quelques études concernant des interactions utilisent en général des doses aiguës de pesticides, alors qu'il a été démontré que les abeilles peuvent également être exposées de façon chronique par l'accumulation des pesticides dans les ruches (Chauzat et al., 2011; C. A. Mullin et al., 2010c).

Avant d'étudier les effets d'interactions entre un pesticide et un virus, j'ai donc exploré certaines questions concernant chacun de ces facteurs de stress (biotique et abiotique) :

- Est-il possible de substituer l'injection de virus pour reproduire et étudier les infections virales en conditions expérimentales d'une façon plus proche des voies naturelles de transmission ?
- Quel est le devenir du thiaméthoxam et de son métabolite la clothianidine dans des abeilles exposées de façon chronique à des doses sublétales ?

Sur la base de ces résultats préliminaires j'ai développé des conditions expérimentales plus proches des conditions naturelles de co-expositions et ai ainsi évalué les interactions qui pouvaient en découler, de la façon la plus répétable possible, tout en connaissant mieux le

comportement du pesticide modèle chez l'abeille. Les questions alors posées étaient les suivantes :

- Quels sont les effets d'une co-exposition entre le CBPV ou le DWV et le thiaméthoxam :
 - Sur la mortalité des abeilles ?
 - Sur les charges virales du virus étudié (et éventuels effets colatéraux sur les autres virus présents naturellement dans les abeilles testées) ?
 - Sur différents traits du comportement ?

- Les effets observés peuvent-ils être expliqués par un effet de l'un, de l'autre ou de l'interaction entre ces facteurs sur l'expression de gènes de l'immunité ou de la détoxification ?

Les réponses à ces questionnements scientifiques sont apportées dans les trois chapitres et sous chapitres de la partie expérimentale de ce manuscrit.

Le chapitre 1 traite de **la métabolisation du thiaméthoxam et des effet de la co-exposition avec le CBPV chez l'abeille domestique**, en conditions contrôlées en laboratoire. Après une brève introduction commune il est divisé en trois parties, correspondant à tout d'abord une expérience préliminaire de développement d'une méthode de transmission du CBPV par contact, puis à deux articles scientifiques :

Article 1 : *Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis in honeybees*. **Marianne Coulon**, Frank Schurr, Anne-Claire Martel, Nicolas Cougoule, Adrien Bégaud, Patrick Mangoni, Anne Dalmon, Cédric Alaux, Yves Le Conte, Richard Thiéry, Magali Ribière-Chabert and Eric Dubois (article accepté et en voie de publication dans *Pesticide Biochemistry and Physiology* au 21/10/2017).

Article 2 : *Chronic exposure to thiamethoxam can promote Chronic bee paralysis virus infections in honeybees*. **Marianne Coulon**, Frank Schurr, Anne-Claire Martel, Nicolas Cougoule, Adrien Bégaud, Patrick Mangoni, Gennaro Di Prisco, Anne Dalmon, Cédric Alaux, Magali Ribière-Chabert, Yves Le Conte, Richard Thiéry, and Eric Dubois.

Le chapitre 2 est divisé en deux parties, l'une concernant la co-exposition du thiaméthoxame avec le DWV en conditions naturelles dans la colonie, l'autre décrivant l'obtention d'un clone cDNA du DWV et les tests d'infectivité. Après un en-tête introductif rappelant les questions de recherche et la démarche suivie ces deux parties sont présentées sous la forme d'articles scientifiques :

Article 3 : *Interactions between thiamethoxam and Deformed wing virus can drastically impair behaviour of free flying honey bees.* **Marianne Coulon**, Anne Dalmon, Gennaro Di Prisco, Alberto Prado, Florine Arban, Magali Ribière-Chabert, Eric Dubois, Richard Thiéry, Yves Le Conte

Article 4 : *Construction of a cDNA clone of Deformed wing virus A and A/B recombinant (genus Iflavirus, family Iflaviridae).* **Marianne Coulon**, Cécile Desbiez, Benoît Moury, Cédric Alaux, Yves Le Conte, Magali Ribière-Chabert, Richard Thiéry, Eric Dubois, Anne Dalmon. (Cet article n'est pas publiable tel quel et des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de le compléter en vue d'une publication).

Le dernier chapitre décrit une discussion générale de l'ensemble de ces résultats et les perspectives scientifiques qui y sont liées.

Chapitre 1 :

Etude en laboratoire des effets de la co-exposition d'abeilles émergentes au CBPV et au thiaméthoxam

Ce chapitre décrit les travaux effectués au laboratoire de l'Anses de Sophia Antipolis sur les interactions CBPV / thiaméthoxam *in vitro*.

Dans un premier temps, des expériences préliminaires ont été nécessaires. En effet, il n'existait pas à notre connaissance de données spécifiques concernant la métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine par les abeilles exposées de façon chronique, ni de méthode expérimentale de transmission du CBPV autre qu'une injection. Les questions de recherches précédemment citées auxquelles j'ai cherché à répondre dans ce premier chapitre sont les suivantes :

- Est-il possible de se passer d'injection pour transmettre et étudier l'infection des abeilles par le CBPV, dans des conditions les plus proches possibles des infections naturelles ?
- Quel est le devenir du thiaméthoxam et de son métabolite la clothianidine dans les abeilles exposées chroniquement à des doses sublétales ?
- Quels sont les effets d'une co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam de façon chronique ?
 - Sur la mortalité des abeilles ?
 - Sur les charges virales du CBPV ?
 - Sur la consommation en sirop ?
- Les effets observés peuvent-ils être expliqués par un effet de l'un, de l'autre ou de l'interaction entre ces facteurs sur l'expression de gènes de l'immunité ou de la détoxification ?

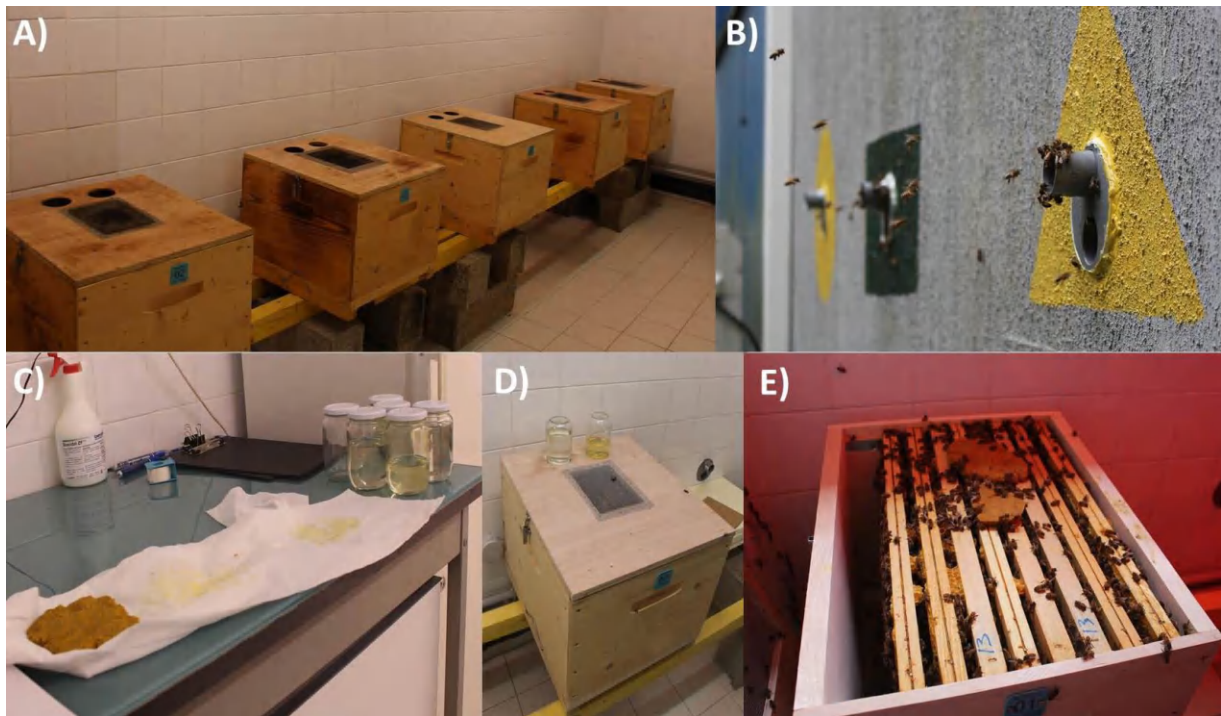


Figure 21 : Le rucher hivernal utilisé pour fournir les abeilles d'une partie des expérimentations effectuées au laboratoire de l'Anses de Sophia-Antipolis (expériences effectuées de Janvier à Mars).

A) organisation des ruches à l'intérieur (température constante gardée autour de 20°C) ; B) accès à l'extérieur pour les vols d'hygiène et élimination des abeilles mortes, début de butinage au printemps ; C) préparation de la nourriture : à gauche, pâte protéinée (décrite dans ce chapitre) à droite eau et sirop de saccharose 50 % ; D) ruche fermée avec nourrisseurs ; E) ruche ouverte avec la pâte protéinée placée sur les cadres ; l'ouverture des ruches se fait en lumière rouge, invisible pour les abeilles, afin qu'elles restent le plus calmes possible (photographie : ANSES - Nicolas Cougoule).

Ainsi, pour minimiser l'impact dû à l'injection du virus, et pour se rapprocher au maximum de ce qu'il pourrait se passer au sein d'une colonie dans les conditions naturelles, j'ai tout d'abord développé une méthode de **transmission du CBPV** par contact entre abeilles.

Puis, pour connaître le devenir de mon pesticide modèle dans l'abeille, j'ai suivi la **cinétique de métabolisation du thiaméthoxam** dans des abeilles en exposition chronique.

J'ai ensuite utilisé la méthode de transmission obtenue ainsi que les nouvelles connaissances obtenues sur la cinétique du thiaméthoxam pour développer et effectuer une première expérience de co-exposition chronique au thiaméthoxam et CBPV chez des abeilles en cagette, mesurant les effets de la co-exposition sur la survie des abeilles, leurs charges virales en CBPV, certaines réponses métaboliques, ainsi que la métabolisation du thiaméthoxam. Les résultats obtenus lors de ces expériences seront présentés sous la forme d'un premier article, soumis au journal *Pesticide Biochemistry and Physiology* le 12/04/2017.

Enfin, pour approfondir les résultats obtenus dans ce premier article et découvrir l'origine des interactions observées sur les mortalités et charges virales des abeilles testées, j'ai reproduit l'expérience en étudiant la transcription de gènes de l'immunité et de la détoxification. Les résultats obtenus seront présentés sous la forme d'un second article.

Transmission CBPV

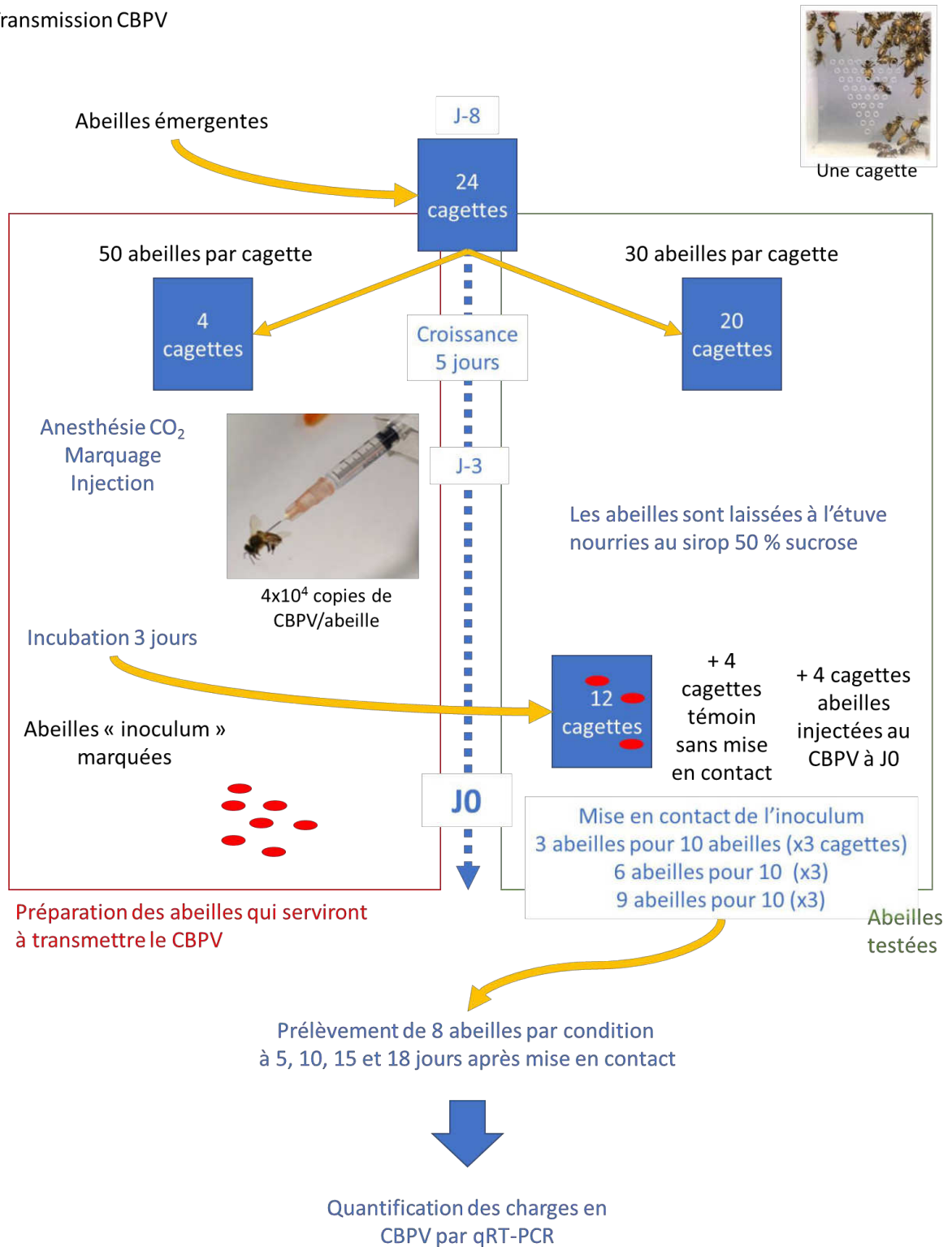


Figure 22 : Schéma récapitulant la méthode de transmission du CBPV par contact entre abeilles infectées et abeilles saines développée et utilisée dans ce chapitre.

1. Développement d'une méthode de transmission du CBPV par contact

1) Introduction

Le CBPV est déjà connu comme pouvant se propager facilement par contact lorsque les abeilles sont confinées dans la ruche (Bailey et al., 1983). Plus récemment, il a été avancé aussi le rôle des fèces des abeilles infectées dans la dissémination virale au sein de la colonie (Ribière et al., 2007). Cette dernière étude a démontré également qu'une transmission était possible par application du virus sur la cuticule épilée du thorax d'abeilles. Expérimentalement, la transmission peut aussi être réalisée par injection thoracique de 4×10^4 copies de virus purifié (Chevin et al., 2012). Toutefois, ces deux voies expérimentales de transmission du CBPV induisent un stress lié à l'injection et à la manipulation individuelle des abeilles qui s'ajoute aux effets de l'infection du pathogène et peut induire des biais expérimentaux.

Afin de diminuer au maximum les stress subits par les abeilles testées, nous avons décidé de développer une méthode, reproductible, d'exposition au CBPV en conditions expérimentales, proche du mode naturel de transmission entre des abeilles infectées, symptomatiques et des abeilles saines (figure 22). J'ai donc mis en présence d'abeilles saines des abeilles préalablement injectées avec une quantité de CBPV connue pour provoquer la paralysie chronique (4×10^4 copies de virus purifié (Chevin et al., 2012)), présentant des signes cliniques de paralysie chronique (3 à 4 jours après l'injection). Ces abeilles injectées ont donc servi d'inoculum en transmettant le virus par contact, remplaçant l'injection thoracique ou l'application du virus sur la cuticule des abeilles.

Afin de définir la proportion d'abeilles préalablement infectées pour obtenir une diffusion virale, suffisante, j'ai testé l'introduction de nombres différents d'abeilles malades par cagettes.

2) Matériel et méthodes

Toutes les expériences de chapitre ont été réalisées en cagette, en conditions contrôlées proche des tests standards d'exposition aux pesticides (méthode n° 230 ; Commission des Essais Biologiques and Association Française de protection des plantes, 2014). Cependant, nous avons adapté quelques paramètres au regard du risque infectieux. Notamment, nous avons remplacé l'alimentation en miel et pollen par du Candy vendu sous vide (Apifonda, Südzucker AG, Allemagne) du sirop de saccharose à 50% (D⁽⁺⁾-sucrose, Acros Organics, Fisher Scientific, USA) et une solution protéique spécifique (sirop 50% + 1% Provita'Bee, ATZ Diététiques, France), afin d'éviter toute contamination des abeilles mises en cagette. Certains virus sont en effet connus pour être transmissibles *via* le pollen (Singh et al., 2010). De plus, nous n'avons pas non plus standardisé les expérimentations par rapport à l'insecticide référence, le diméthoate. En effet, notre objectif à terme était d'observer l'effet de la co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam relativement aux effets individuels de ces stress, et non en fonction de la référence de toxicité.

Fin avril 2015, des abeilles émergentes provenant d'une ruche sans signe clinique de paralysie chronique ni infection supérieure à la limite de quantification de la PCR quantitative ($10^{3,9}$ copies/abeille) ont été réparties dans 24 cagettes selon les modalités suivantes : trois groupes d'abeilles exposées mises en présence d'une, de trois ou de six abeilles malades pour 10 abeilles saines (pour chaque conditions : 4 cagettes de 30 abeilles par jour de prélèvement), un groupe de 30 abeilles témoins négatifs (sans mise en contact d'abeilles infectées ; 1 cagette par jour de prélèvement), et un groupe d'abeilles témoin positif (inoculées par voie intrathoracique ; 1 cagette par jour de prélèvement). Les abeilles témoin positif et celles préalablement malades ont reçu la même dose de virus par injection (estimé par RT-PCR quantitative à 4×10^4 copies de génomes viraux par abeille). Le suivi a été réalisé à 5, 10, 15 et 18 jours après contact avec les abeilles infectées en analysant les mortalités et la charge virale individuelle de huit abeilles, par RT-PCR quantitative (Blanchard et al., 2012). Les statistiques effectuées comprennent une ANOVA, ainsi qu'un post hoc de TukeyHSD (logiciel PAST) afin de comparer les charges virales des différents groupes.

3) Résultats et discussion

Les charges virales des abeilles ne présentaient pas de différences significatives en fonction de la proportion d'abeilles malades ajoutées à la cage, variant de 10% à 30% (Figure 24). Les charges virales des abeilles infectées par injection ne sont pas non plus significativement différentes de celles infectées par mise en présence d'abeilles malades. On observe que de faibles charges virales ont été détectées chez les abeilles du groupe témoin négatif. Cependant, ces faibles charges virales, proches voire en dessous de la limite de quantification de la méthode, sont stables dans le temps et restent significativement inférieures aux charges virales observées dans les abeilles des autres groupes ($p < 0.05$).

Nous avons également procédé à une vérification, afin de savoir si les virus quantifiés résultaient bien d'une répllication chez l'abeille et n'étaient pas simplement adsorbés à la cuticule à l'extérieur des abeilles testées. Ainsi, une quantification sur de nouvelles abeilles a été effectuée après lavage avec du tampon phosphate additionné de RNases (10 U, RNase A, Roche). On observe une différence significative entre la médiane des témoins (Figure 25) et celle des abeilles en contact avec les abeilles infectées ($p = 0.03$). A l'inverse il n'y a pas de différence significative entre les abeilles en contact avec des abeilles infectées et des abeilles ayant subi une injection de CBPV ($p = 0.06$). On peut en conclure que les abeilles en contact avec des malades répliquent le virus, puisque leurs charges sont supérieures à celles des témoins et voisines des charges virales observées chez les abeilles inoculées avec le CBPV.

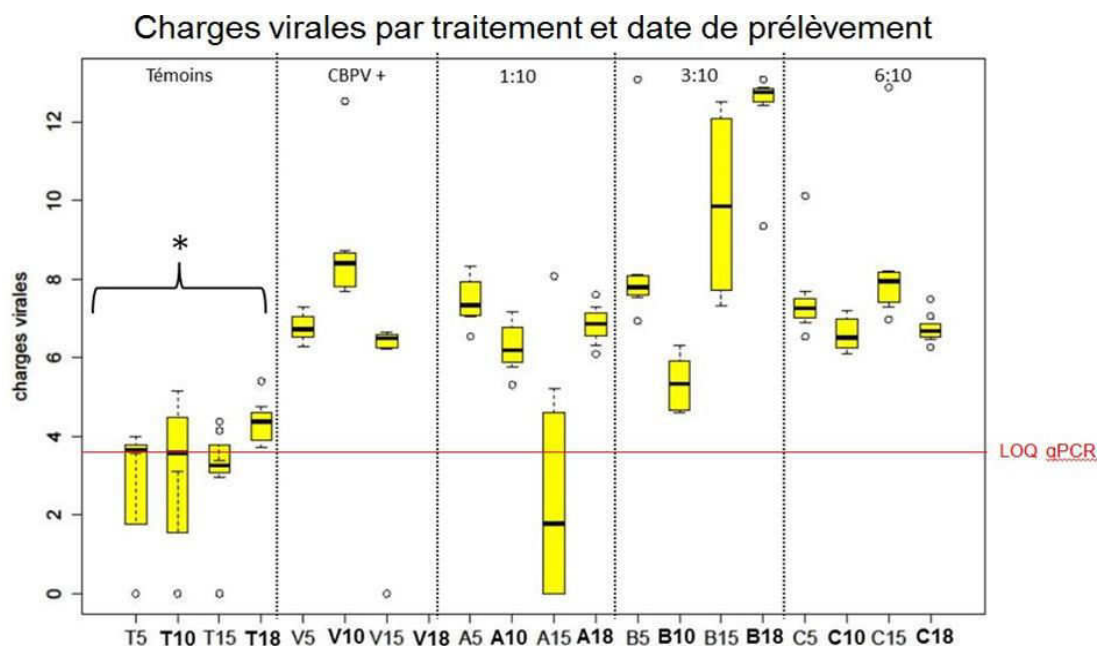


Figure 23 : Représentation graphique des charges virales (\log_{10} équivalent de copies génome viral par abeille) en fonction modalités d'exposition des abeilles au CBPV : T = abeilles témoin, V = abeilles inoculées par le CBPV, Abeilles au contact d'abeilles inoculées : A = 1 :10, B = 3 :10 et C = 6 :10) et par date de prélèvement (« 5 » dans le graphique = J5, « 10 »=J10, « 15 »=J15, « 18 »= J18 après l'inoculation ou le début de la mise au contact des abeilles symptomatiques de la paralysie chronique). Ligne rouge = limite de quantification de la qPCR ($10^{3.9}$ copies par abeille).

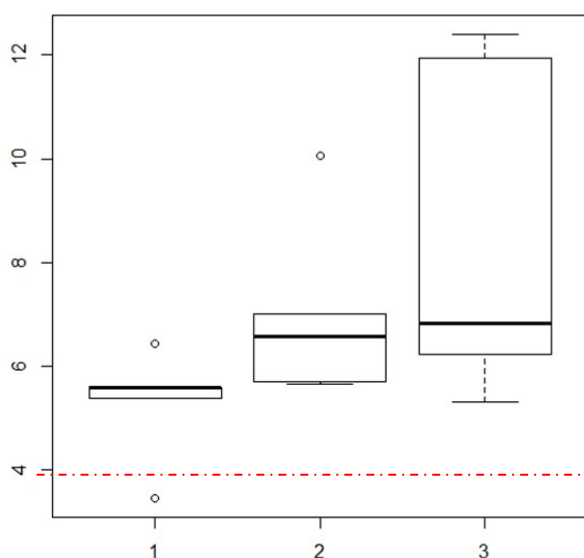


Figure 24 : Vérification des charges après lavage à la RNase. 1 = abeilles témoin, 2 = abeilles au contact d'abeilles inoculées par injection, 3 = abeilles inoculées par injection avec le CBPV (4×10^2 copies/abeille). Ligne rouge en pointillés : limite de quantification ($10^{3.9}$ copies par abeille).

En conclusion, nous avons développé une méthode *in vitro* de transmission expérimentale du CBPV entre abeilles saines et abeilles malades infectées par contact avec des abeilles préalablement infectées par injection (inoculum). Cette méthode est répétable quelle que soit la proportion d'abeilles « inoculum » et moins invasive qu'une injection directe du virus. Cette méthode permet d'obtenir des abeilles infectées dans des conditions proches du mode naturel de transmission du CBPV au sein de la ruche. Ces travaux ont fait l'objet d'un poster présenté aux 4^{èmes} Journées de la Recherche Apicole les 2 et 3 février 2016, présenté en Annexe 1.

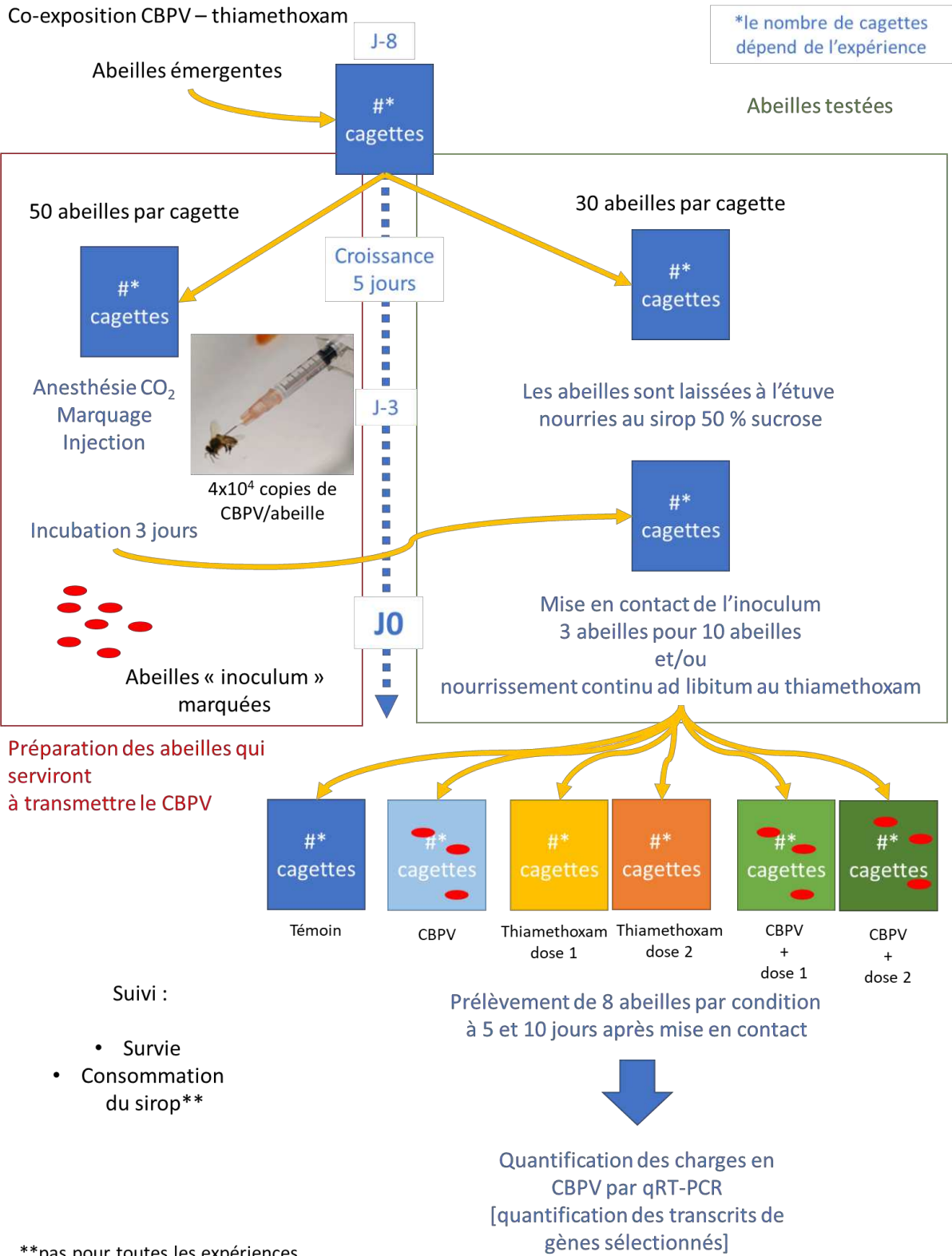


Figure 25 : Schéma récapitulant la méthode utilisée pour tester une co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam en exposition chronique et conditions contrôlées.

2. Métabolisation du thiaméthoxam et co-exposition avec le CBPV

Pour déterminer s'il existait une interaction entre le thiaméthoxam et le CBPV, j'ai utilisé la méthode de transmission non invasive précédemment décrite. J'ai ainsi pu expérimenter les effets conjoints d'une infection par le CBPV et d'une exposition chronique au thiaméthoxam sur la survie, et suivre les charges virales en CBPV d'abeilles en cagettes (figure 25). En amont, j'ai également réalisé une expérience qui m'a permis de montrer la cinétique de métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine chez l'abeille domestique (figure 26).

Les résultats obtenus ont été valorisés dans un article accepté dans *Pesticide Biochemistry & Physiology* (Coulon et al., n.d.)(21/10/2017).

Métabolisation du thiamethoxam

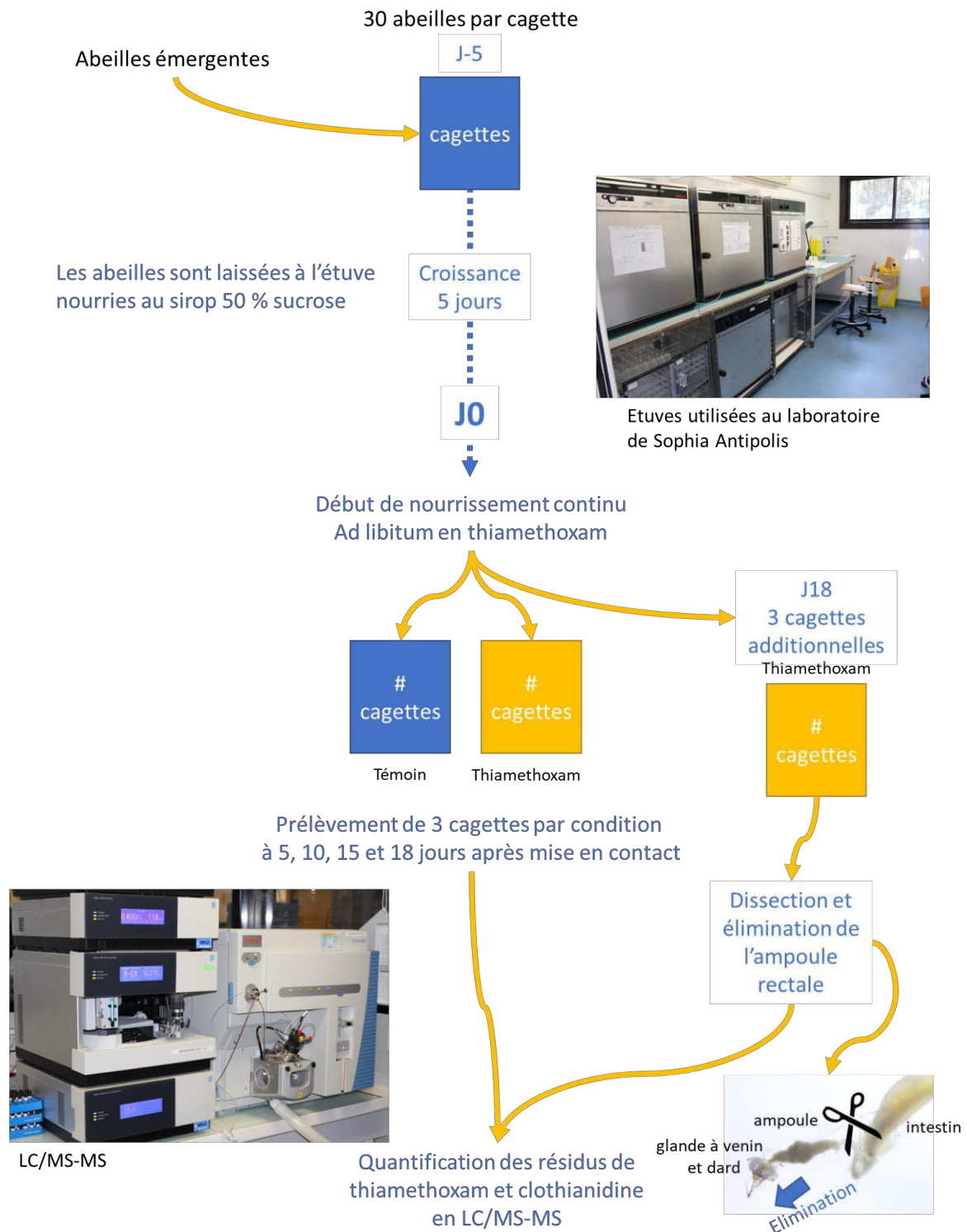


Figure 26: Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de suivre la cinétique de dégradation du thiaméthoxam en clothianidine, lors d'une exposition chronique et en conditions contrôlées.

Article 1:

Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the *Chronic bee paralysis virus* in honeybees

M. Coulon^{a, b}, F. Schurr^a, A.-C. Martel^a, N. Cougoule^a, A. Bégaud^a, P. Mangoni^a, A. Dalmon^b,
C. Alaux^b, Y. Le Conte^b, R. Thiéry^a, M. Ribière-Chabert^a, E. Dubois^a

^aANSES Sophia Antipolis, Unit of Honeybee Pathology, 105, route des Chappes, 06902
Sophia-Antipolis, France

^bINRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, 84914 Avignon, France
Contact: eric.dubois@anses.fr

Abstract

Pathogens and pesticides are likely to co-occur in honeybee hives, but much remains to be investigated regarding their potential interactions. Here, we first investigated the metabolisation kinetics of thiamethoxam in chronically fed honeybees. We show that thiamethoxam, at a dose of 0.25 ng/bee/day, is quickly and effectively metabolised into clothianidin, throughout a 20 day exposure period. Using a similar chronic exposure to pesticide, we then studied, in a separate experiment, the impact of thiamethoxam and *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) co-exposure in honeybees. The honeybees were exposed to the virus by contact, mimicking the natural transmission route in the hive. We demonstrate that a high dose of thiamethoxam (5.0 ng/bee/day) can cause a synergistic increase in mortality in

co-exposed honeybees after 8 to 10 days of exposure, with no increase in viral loads. At a lower dose (2.5 ng/bee/day), there was no synergistic increase of mortality, but viral loads were significantly higher in naturally dead honeybees, compared with sacrificed honeybees exposed to the same conditions. These results show that the interactions between pathogens and pesticides in honeybees can be complex: increasing pesticide doses may not necessarily be linked to a rise in viral loads, suggesting that honeybee tolerance to the viral infection might change with pesticide exposure.

Keywords

Thiamethoxam, pathogen, synergistic interaction, co-exposure, survival, tolerance

1. Introduction

The Western honeybee, *Apis mellifera* sp., is a key ecological species, both for the pollination services it procures (Potts et al., 2010), and for its role as a bio-indicator of environmental pollution (i.e. in-hive concentration of xenobiotics fortuitously collected in the field) (Celli and Maccagnani, 2003; Poquet et al., 2016). During the last decades, an alarming amount of honeybee colony losses has been reported in the Northern Hemisphere (Neumann and Carreck, 2010), and the number of colonies is decreasing whereas demand for crop pollination is growing (Aizen and Harder, 2009; Breeze et al., 2014; Potts et al., 2010). In Europe, overwintering losses ranged from 2.4% to 15.4% and from 0.04% to 11.1% of seasonal losses (i.e. during the foraging season), in 2014 (Laurent et al., 2015). Average losses reached 51.1% over the whole year in the USA for the same period (Lee et al., 2015). These losses can be caused by various factors, including anthropogenic changes (growing use of pesticides, landscape alteration – decrease in resource availability), and introduction of exotic parasites, such as the mite *Varroa destructor*, the microsporidian parasite *Nosema ceranae*, and viruses (Potts et al., 2010). In addition, there is growing evidence that these factors may interact and exacerbate bee mortality (Goulson et al., 2015).

Neonicotinoids, a family of acetylcholine receptor inhibitors, which represented more than 25% of the insecticides on the market in 2010 (van der Sluijs et al., 2013), are increasingly

blamed for causing high mortalities in laboratory conditions, as well as colony losses, either alone (Henry et al., 2012; Tison et al., 2016) or in conjunction with other stress factors (Alaux et al., 2010a; Doublet et al., 2015a; Nazzi and Pennacchio, 2014; Vidau et al., 2011). By binding with high affinity to acetylcholine receptors, they effectively block the binding of acetylcholine and overstimulate cells, leading to paralysis and death of cells and/or of individuals (Nauen et al., 2003). Thiamethoxam, a nitro-substituted neonicotinoid, is one of the most commonly used insecticides worldwide, either as a systemic insecticide in seed coatings, or directly sprayed on crops (Nauen et al., 2003; van der Sluijs et al., 2013). Recent studies have shown sub-lethal effects of low-dose exposure to thiamethoxam during homing flights in honeybees (Henry et al., 2012). In addition, thiamethoxam is known to be converted into its main metabolite, clothianidin, in plants and insects (Benzidane et al., 2010; Nauen et al., 2003). However, the metabolisation kinetics has not been described for honeybees. Clothianidin, which is also commercialised as an insecticide on its own, is reportedly slightly more toxic than thiamethoxam (clothianidin 48 h oral median lethal dose 50% [LD50]: 2.69 ng/bee ; thiamethoxam 48 h oral LD50: 4.41 ng/bee – Laurino et al., 2011). Thiamethoxam is one of the most used pesticides, on crops attracting honeybees (like oilseed rape – Nauen et al., 2003), its potential interaction with pathogens should be investigated.

Indeed, pathogens, and notably viruses, are also frequently incriminated in the decline of domestic honeybees. About 26 honeybee viruses have been described, but only some cause visible symptoms, such as brood and or adult bee mortalities, paralysis or deformed wings, and have been correlated with colony losses (Dainat et al., 2012; Desai and Currie, 2016; Genersch et al., 2010; van Engelsdorp et al., 2013). Among these viruses, the seven most prevalent in the Northern Hemisphere are: *Acute bee paralysis virus* (ABPV) or its related viruses *Israel acute paralysis virus* and *Kashmir bee virus* (forming together the AKI viral complex), *Deformed wing virus* (DWV), *Sacbrood virus* (SBV), *Black queen cell virus* (BQCV), and *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) (Aubert et al., 2008; Genersch and Aubert, 2010; Laurent et al., 2015c; Tentcheva et al., 2004). In USA and France, their prevalence was described to be respectively about 14% to 22% and 17% to 58% for AKI viral complex , 85% and 97% for DWV, 86% for SBV (prevalence in France), 90% and 86% for BQCV, and 16% and 28% for CBPV (Aubert et al., 2008; Laurent et al., 2015c; Tentcheva et al., 2004; Traynor et al., 2016)). CBPV is different in many ways from the other honeybee viruses belonging to the *Picornavirales* order (such as DWV [*Iflaviridae*] or ABPV [*Dicistroviridae*]), which only contains positive RNA strand viruses that translate directly into one polyprotein (Genersch

and Aubert, 2010). Not yet classified, CBPV is close to *Nodaviridae* and *Tombusviridae* virus families, possesses an anisometric structure, and is composed of two separate positive RNA strands (Blanchard et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2010, 2007; Youssef et al., 2015). Despite the virus being present in one quarter of tested hives in France (Tentcheva et al., 2004), only 2% of specific clinical signs (see below) were observed during the French EPILOBEE surveillance programme (Laurent et al., 2015). Most honeybee viruses often cause covert infections: they can be present in a great number of hives and yet not trigger any observable clinical symptoms (Aubert et al., 2008). The onset of an overt infection can be caused by the transmission of the virus by *Varroa destructor*, for DWV, ABPV, IAPV, and KBV, for example (Carreck et al., 2010; Möckel et al., 2011). There is no evidence of CBPV transmission by *Varroa* mite. However, covert infections can evolve into overt infections (with clear clinical symptoms such as piles of dead bees in front of the hives and bees that are unable to fly, with tremors, paralysis, and sometimes a loss of hair and a darker colour of individuals) when CBPV-infected bees have been confined in populous hives for a long period of time (Ribière et al., 2010). The authors suggested that this could be due to bad weather during spring and to the capacity of CBPV to be transmitted by contact among bees, especially when close contact causes abrasion of the cuticle. Individuals developing clinical signs has been measured at 10^8 to up to 10^{10} copies of CBPV per honeybee (Blanchard et al., 2012; Chevin et al., 2012). The properties of the CBPV, and the relatively high numbers of infected apiaries, make this virus interesting in co-exposure studies.

A honeybee colony can potentially concentrate pesticides from nearby (up to 10 km) crops through its foraging and storing activity. The hive is also a good place for pathogen development, due to high population numbers and regulated temperature. Because of these two factors, it is highly probable that co-exposure of pesticides and pathogens will occur in the field (Poquet et al., 2016). Such co-exposures can lead to interactions, which can be additive, antagonistic or synergistic, between the stressors (Holmstrup et al., 2010). Significant effects of co-exposure between pesticides and viruses have already been observed, such as an increase in BQCV loads in nurse bees fed pollen containing a mix of chlorpyrifos, boscalid and pyraclostrobine (DeGrandi-Hoffman et al., 2013), or an increase in DWV loads in honeybees exposed to clothianidin (Di Prisco et al., 2013). Doublet et al., (2014) recorded higher mortalities (and an increase in BQCV loads) in honeybee larvae exposed to thiacloprid. Pesticide exposure, by increasing virus loads, could lead to overt infections. The co-exposure

of honeybees to CBPV and thiamethoxam, while likely to occur in the field, has not yet been investigated.

In the present study, we describe the metabolisation kinetics of thiamethoxam into its main metabolite, clothianidin, in honeybees. Then we chronically co-exposed honeybees, in laboratory conditions, to CBPV and to different concentrations of thiamethoxam, in order to measure the effect of a potential interaction on survival, and on viral loads in individual honeybees.

2. Materials and Methods

2.1. [Thiamethoxam-contaminated syrup](#)

A certified pesticide standard for thiamethoxam (99% purity) was obtained from Techlab (Saint-Julien-lès-Metz, France). Pesticide concentration in syrup was adjusted to expose honeybees to the intended daily doses, taking into account a previously measured mean daily consumption of 25 µL of 50% sucrose syrup per bee. A standard working solution of thiamethoxam at 100 mg/L (prepared in water) was diluted in 50% sucrose, to obtain the final concentrations of 10 µg/L, 100 µg/L and 200 µg/L, corresponding to the expected daily doses of 0.25, 2.5 and 5.0 ng/bee, respectively. Thiamethoxam syrup solutions were tested to ensure the concentration and the absence of degradation into clothianidin.

2.2. [Emerging honeybees](#)

Emerging honeybees were obtained from previously tested healthy colonies selected in ANSES Sophia Antipolis laboratory apiary. For winter experiment, six colonies from this apiary were kept in an indoor apiary (winter apiary) maintained at 25°C, with access to the outdoors for cleansing flights, fed with 50% sucrose syrup, with water, and with paste composed of frozen pollen mixed with Fructoplus syrup (Icko Apiculture, Bollène, France). Emerging honeybees were pooled to minimise colony-born bias and distributed in cages (30 bees per cage of about 780 cm³, with a capacity of 100 bees, built from Pain, 1966). The cages were maintained in incubators (34°C, with saturated humidity). Caged bees were fed *ad libitum* with 50% sucrose syrup, and 50% sucrose syrup supplemented with 1% protein

(Provita'Bee, ATZ Diététiques, France), and crystallised sugar paste for 5 to 9 days after emergence. After this “growth period”, the sugar paste and the 50% sucrose syrup supplemented with protein were removed.

2.3. Experiment 1: metabolism kinetics of thiamethoxam

Twenty-eight cages were prepared in January 2016 (overall 840 emerging bees) from four healthy-colonies (winter apiary). After a 5 day “growth period”, twenty-one cages were chronically exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam *via* the sole remaining feeder filled with thiamethoxam-contaminated syrup (10µg/L). Seven control honeybee cages were fed with 50% sucrose syrup without thiamethoxam. Feeders were changed and weighed for syrup intake measurement every day. Survival in all cages was monitored daily.

One control cage was sacrificed (by freezing the bees at -18°C) on day 0 after beginning of the experiment. Then, on day 1, 5, 10, 12, 15, and day 18, one control cage and three exposed cages were sacrificed (for a total of 25 cages). In order to study if thiamethoxam or its metabolite would be excreted by bees in the field, the three remaining cages, fed with thiamethoxam, were sampled on day 18. The bees from these cages were anaesthetised using CO₂ gas and the rectum of each bee was excised by pulling on the last tergite and stinger. All bee samples (whole bees and dissected bees) were stored at -18°C until chemical analysis.

2.4. Experiment 2: CBPV-thiamethoxam co-exposure

Emerging honeybees from three previously tested CBPV-negative colonies were sampled in early July 2015. One group of emerging bees were used to prepare CBPV-infected bees to vector the virus. These bees (n=243) were distributed in 5 cages of 50 honeybees and after 5 days of the “growth period”, they were anaesthetised using CO₂ gas, paint marked, injected in the thorax with 4.0×10^4 copies of purified CBPV, and then left to develop the disease for 4 days in a separate incubator, at 34°C with saturated humidity. At the same time, 54 cages (overall 1620 emerging bees) were prepared from the same colonies. At the end of a 9 days growth period, the feeders were removed and the CBPV and/or thiamethoxam exposure started according to the following six conditions (nine cages per condition): 1. Control bees (bees not exposed to CBPV nor to thiamethoxam); 2. Bees in contact with CBPV-infected

bees (introduction of nine symptomatic bees in each cage, which died from the disease within the first 1 to 3 days (24,69% were dead 1 day after introduction in the cage; 82,72% after 2 days, and 91,98% after 3 days), but weren't removed to continue to act as an inoculum); 3. Bees fed 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam (100 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup); 4. Bees fed with 5.0 ng/bee/day (200 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup); 5. Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam; 6. Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam. Three cages per condition were sampled on day 1, 5 and day 10 after starting the virus and/or pesticide exposure. Survival was monitored daily (unmarked dead bees were removed from the cages, labelled and kept at -18°C). Sampled bees were stored at -18°C until viral analysis.

2.5. [Quantification of thiamethoxam and clothianidin](#)

The neonicotinoid residues were quantified from a pool of 20 honeybees from the same cage (whole bees or dissected bees), using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), according to the protocol described in (Martel and Lair, 2011). Briefly, the pesticides were extracted using acetonitrile and liquid partitioning with *n*-hexane. One clean-up was then performed on a florisil cartridge (1 g, 6 mL) and the extract was analysed by LC-MS/MS.

2.6. [Quantification of viral loads](#)

CBPV load was measured in nine unmarked (i.e. not injected) individual honeybees sampled from the three cages sacrificed at each sampling date (three bees from each cage), or in nine (or as many as possible) dead bees (unmarked) collected at the same sampling date. Each honeybee was crushed in 1 mL 0.01 M phosphate buffer using three tungsten 0.5 mm beads and a TissueLyser (Qiagen) for 30 s at 30 Hz, and repeated three times. The resulting homogenate was then clarified by two successive centrifugations of 10 min, at 8000 x *g* and 4°C. Viral RNA was extracted from 200 µL of supernatant using High Pure Viral RNA kits from Roche Diagnostics, according to the manufacturer's instructions. RNA was recovered in 50 µL of 10 mM Tris-HCL, pH 8.5, supplied in the kit. Retro-transcription into cDNA was performed using random primers and SuperScript's SSRT II kit (Invitrogen) from 12.5 µL of purified RNA (Ribière *et al.*, 2002). Quantitative PCR was carried out on 5 µL of

complementary DNA using protocol and primers from Blanchard et al. (2012) (limit of quantification, LOQ: 3.9 log₁₀ copies per individual).

2.7. Statistics

Survival was established using a Kaplan-Meier estimation (Efron, 1988; Pepe and Fleming, 1989) which allows taking into account the sampled bees in whole cages as censored data (individuals removed from the experiment, but not dead), and curves compared with log-rank tests (Bland and Altman, 2004). Log-transformed viral loads were analysed using a one-way ANOVA test followed by post-hoc *t*-tests or Tukey HSD tests (de Miranda et al., 2013). Synergistic interactions were tested using a χ^2 of compliance test comparing obtained survival measurements for each day with the corresponding calculated expected measurements (Aufauvre et al., 2012; Mcvay et al., 1977).

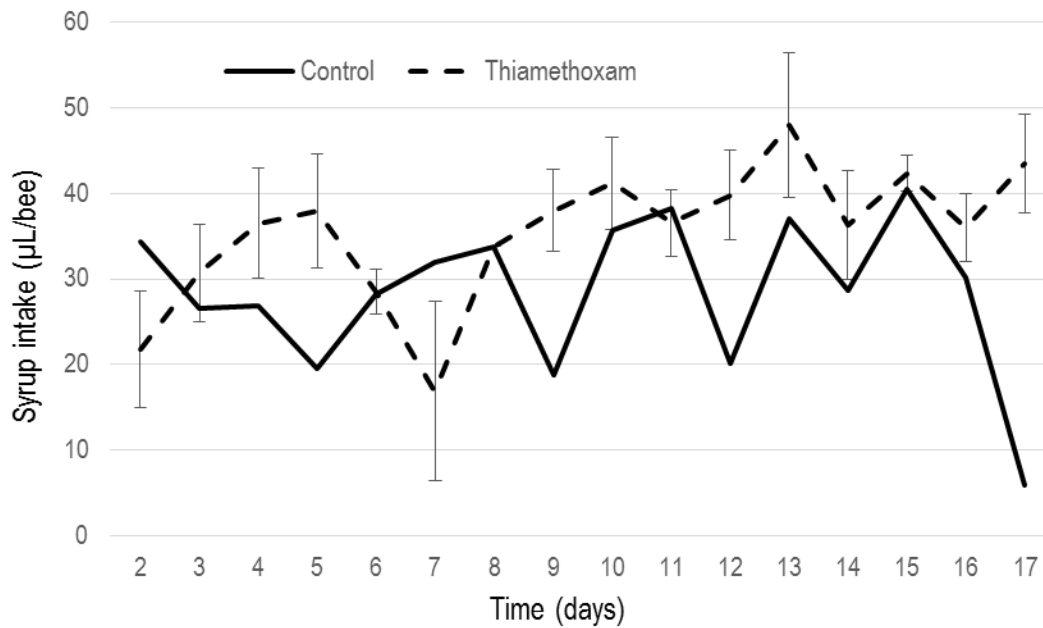


Fig. 1: Syrup intake (µL/bee) for control and thiamethoxam groups, over the course of the metabolisation experiment. Solid line: Control bees fed with 50% sugar syrup, dashed line: Bees exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam in 50% sugar syrup (n=1 cage of 30 bees for control and 3 cages of 30 bees each for thiamethoxam group). Means and standard deviations are shown.

3. Results

3.1. Experiment 1: metabolism kinetics of thiamethoxam

3.1.1. Effects of thiamethoxam on survival and syrup intake

Survival of the honeybees was not affected by pesticide exposure. Kaplan-Meier curves of control and of 0.25 ng/bee/day thiamethoxam-fed bees did not differ ($p=1$; day 10 mortality rates: respectively 2.9% and 2.0%, data not shown).

Mean daily syrup intake over the course of the experiment was significantly higher ($p<0.01$; Fig. 1) for thiamethoxam fed bees (mean: 36 $\mu\text{L}/\text{bee}$; standard deviation <0.01) than for control bees (mean: 28 $\mu\text{L}/\text{bee}$; standard deviation <0.01). According to the intake volume mean, the bees were exposed to 0.36 ng/bee/day instead of the expected 0.25 ng/bee/day.

3.1.2. Metabolisation of thiamethoxam into clothianidin

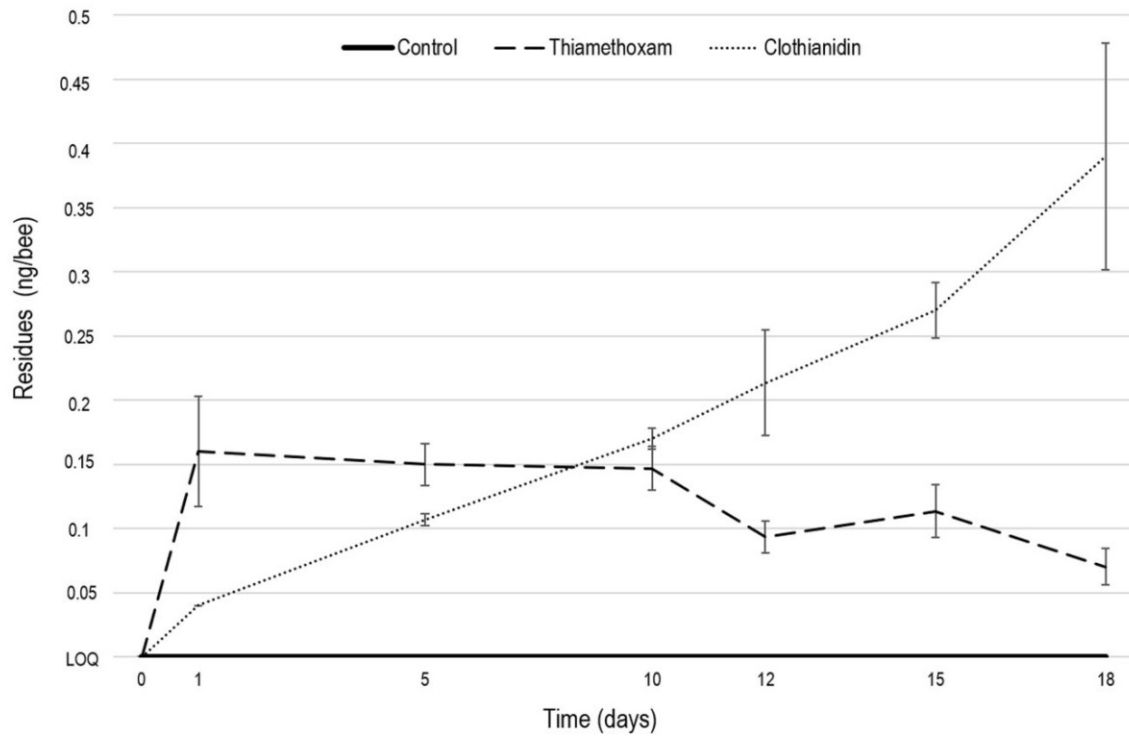


Fig. 2: Metabolisation kinetics of thiamethoxam in chronically exposed honeybees. Solid line: quantity of thiamethoxam in control honeybees (control), dashed line: quantity of thiamethoxam in thiamethoxam-fed honeybees (thiamethoxam), dotted line: quantity of clothianidin in the same thiamethoxam-fed honeybees (clothianidin) (n=1 sample of 20 bees for control and 3 samples of 20 bees each for the thiamethoxam fed bees). Means and standard deviations are shown.

3.1.2. Metabolisation of thiamethoxam into clothianidin

Levels for both neonicotinoids (thiamethoxam and clothianidin) were under the limit of detection (LOD, 0.015 ng/bee) in control bees over the course of the experiment (Fig. 2). Thiamethoxam levels reached 0.15 ng/bee one day after the beginning of exposure and remained stable until day 10. Then, this level dropped to around 0.10 ng/bee on day 12, 15 and 18. In contrast, clothianidin levels increased steadily throughout the experiment, from under 0.05 ng/bee after one day of exposure to almost 0.40 ng/bee after 18 days (Fig. 2). Clothianidin seems to accumulate in the tested honeybees.

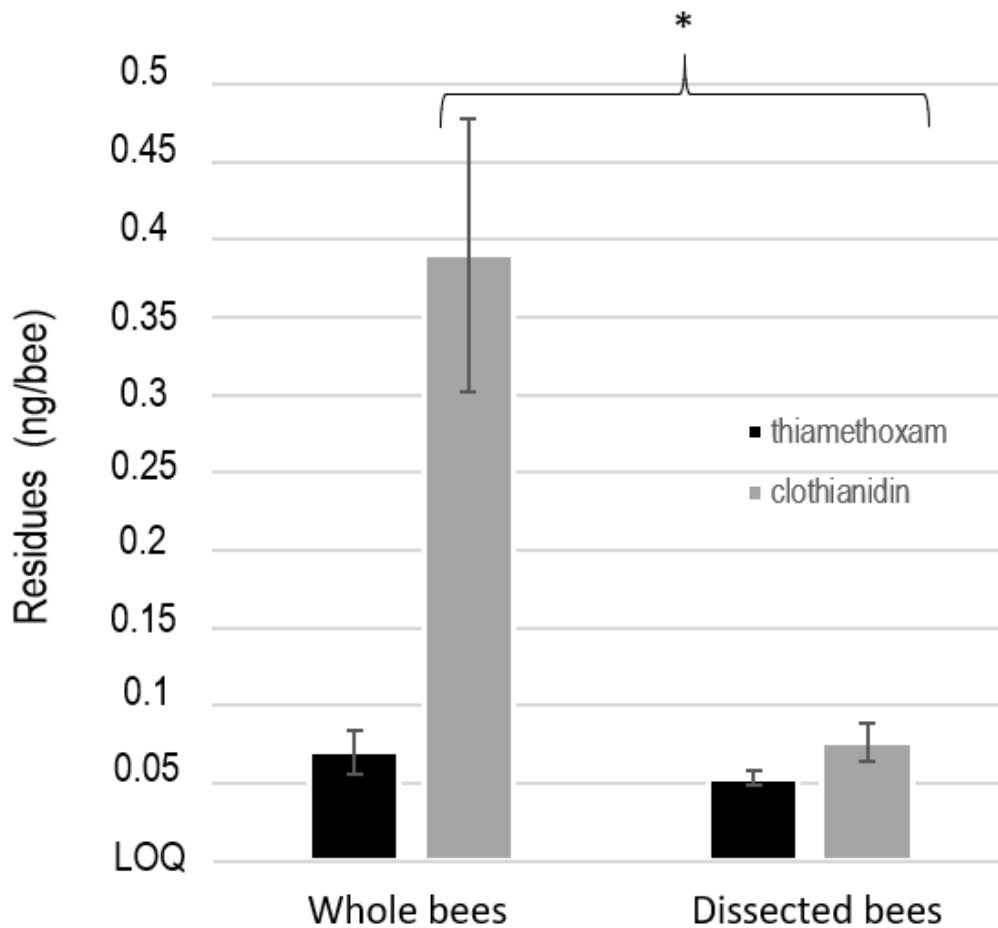


Fig. 3: Comparison of thiamethoxam and clothianidin levels between whole and dissected (rectum excised) honeybees (n=20x3 replicate cages = 60 bees in each group (whole or dissected bees)). Black bars: thiamethoxam measurements; grey bars: clothianidin measurements. Star shows significant difference between the two clothianidin measurements (*: $p = 0.04$). Means and standard deviations are shown.

3.1.3. Comparison of thiamethoxam levels in whole and dissected bees

Thiamethoxam levels between whole bees and dissected bees (without the rectum) after 18 days of chronic exposure did not differ significantly ($p=0.23$), but clothianidin levels were significantly higher in whole bees than in dissected bees ($p=0.04$; Fig. 3), suggesting accumulation in the rectum.

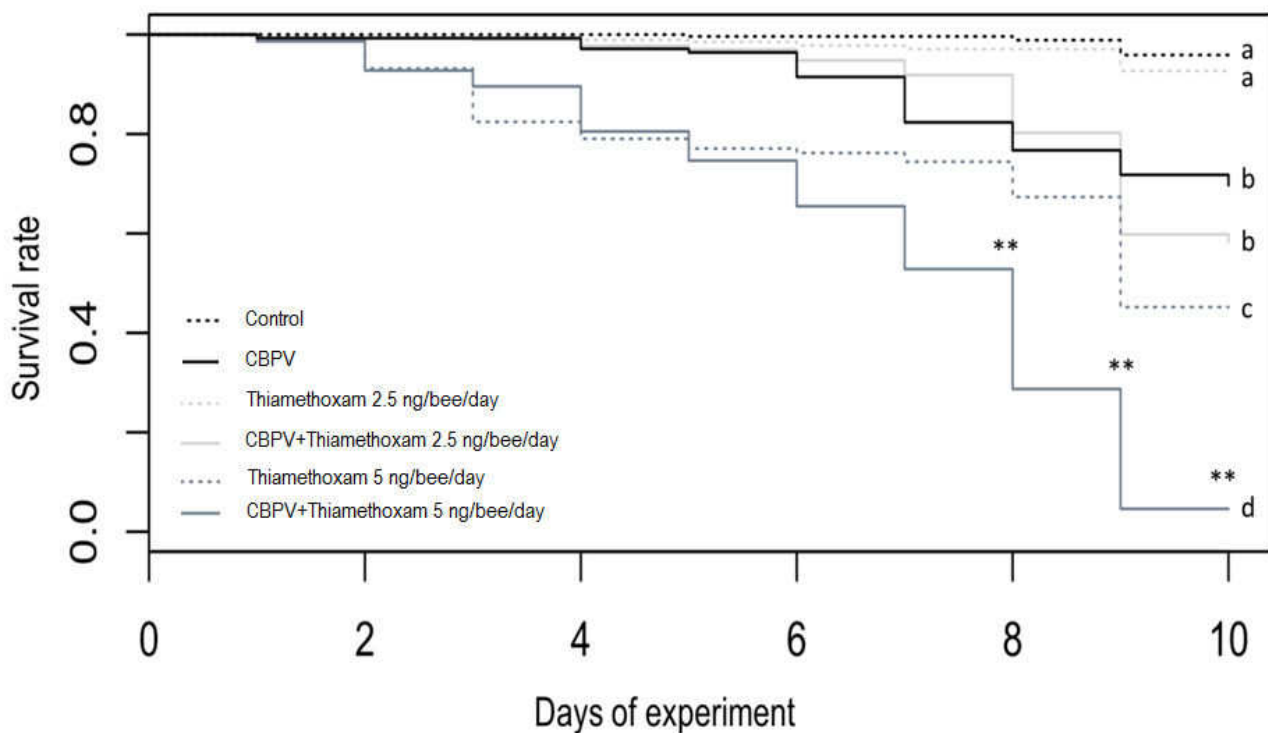


Fig. 4: Survival curves according to Kaplan-Meier estimation. Letters show statistical differences between curves (log-rank test). Dotted black line: control, solid black line: CBPV, dotted light grey line: 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam, solid light grey line: co-exposure between 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV, dotted dark grey line: 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam, solid dark grey line: co-exposure between 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV. Three significantly different groups emerged from the statistical analysis: a) control bees and bees exposed to 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam, b) CBPV and co-exposure to 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV, c) honeybees exposed to 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and d) co-exposure to 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV. Stars denote significance of the χ^2 compliance test and show the synergistic effect of co-exposure on survival (**: $p < 0.01$). At day 0, the honeybees are already 9 days old.

3.2. Experiment 2: CBPV-thiamethoxam co-exposure

3.2.1. Effect of co-exposure on mortality

Survival rates were determined using the Kaplan-Meier estimate (Fig. 4). These rates were distributed in four significantly different groups. The first group, (a), with the highest survival rates (>80% live bees after 10 days of experiment) was composed of control bees and bees fed with 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam. The second group, (b), with lower survival rates, was composed of bees that were only in contact with CBPV-infected bees (69% live bees after 10 days), and bees that were co-exposed to CBPV-infected bees and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam (58% live bees after 10 days). The third group, (c), with yet a lower survival rate, was composed of bees that were fed with 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam (45% live bees after 10 days). Finally, the group with the lowest survival rate, (d) (4.6% live bees after 10 days) was composed of bees that were co-exposed to both CBPV-infected bees and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam.

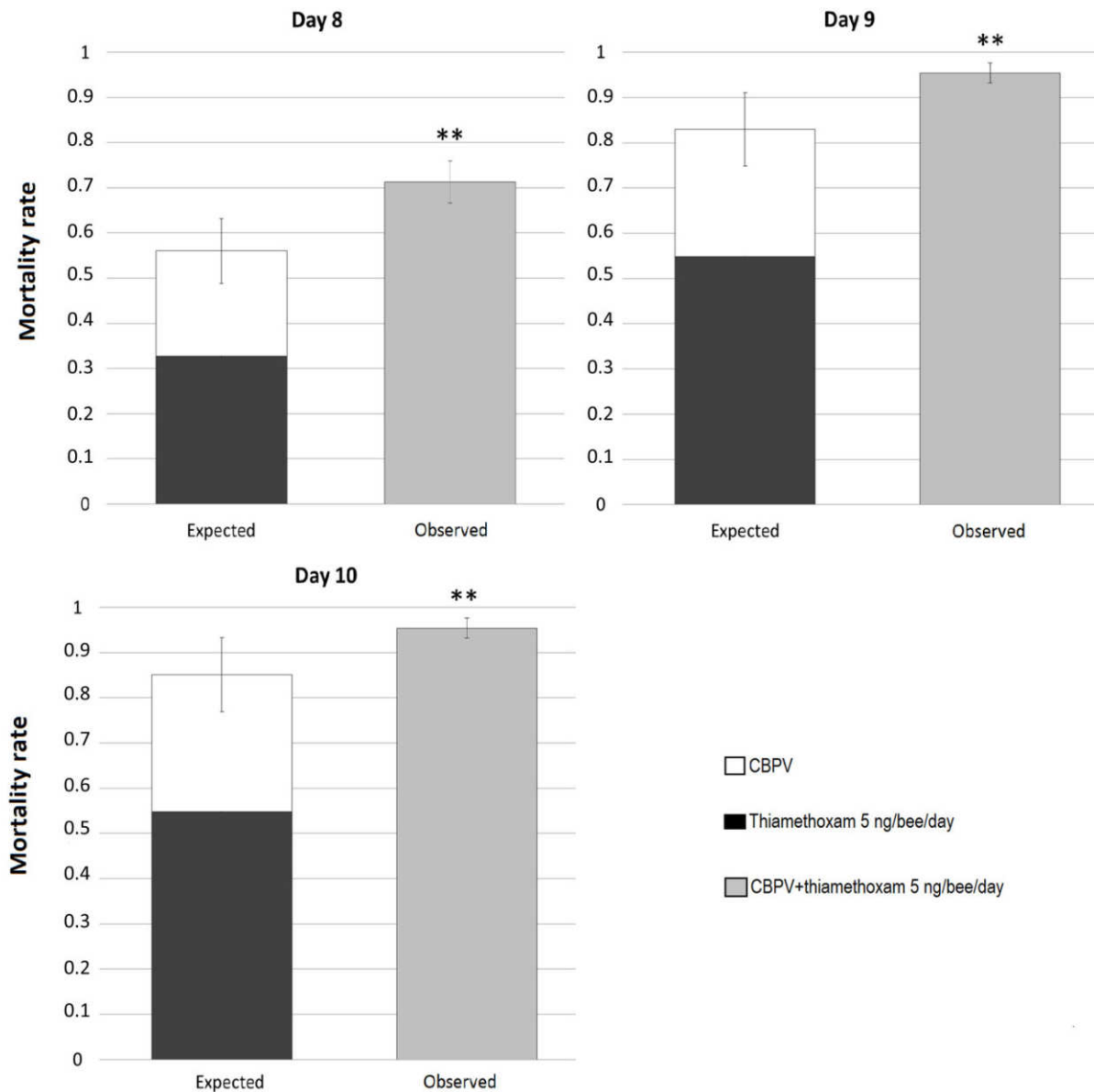


Fig. 5: Comparison between expected mortality rates (additive interactions), and observed mortality rates of honeybees after 8 to 10 days of co-exposure to CBPV and 5.0 ng of thiamethoxam/bee/day. Black bars: mortality rate in honeybees fed thiamethoxam at 5.0 ng/bee/day; white bars: mortality rate in honeybees exposed to CBPV-infected honeybees; grey bars: mortality rate in honeybees co-exposed to CBPV-infected bees and thiamethoxam at 5 ng/bee/day. Stars show significant difference between expected and observed mortality rates (**: $p < 0.01$). Means and standard deviations are shown (n=3 cages for each measurement and day).

A significant effect of co-exposure on mortality was found only at the highest dose of thiamethoxam after up to 8 days of co-exposure ($p < 0.01$; Fig. 5). The survival rate of bees co-exposed to both CBPV and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam was not significantly different from bees that were only exposed to CBPV-infected bees ($p > 0.05$).

The mortality in the co-exposure condition exceeded what would be expected from an additive effect between CBPV and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam (i.e., the effect was higher than the sum of the effects observed in groups exposed to each of the stressors alone). The observed mortality (day 8: $p < 0.01$ [$a = 10.85$]; day 9: $p < 0.01$ [$a = 11.49$]; day 10: $p = 0.01$ [$a = 10.58$]) was much higher than the expected mortality (χ^2 table with 1 df, $a = 6.635$ [$p = 0.01$] or $a = 10.828$ [$p < 0.01$]). This demonstrating that there was a synergistic effect between the CBPV and thiamethoxam at the dose of 5.0 ng/bee/day.

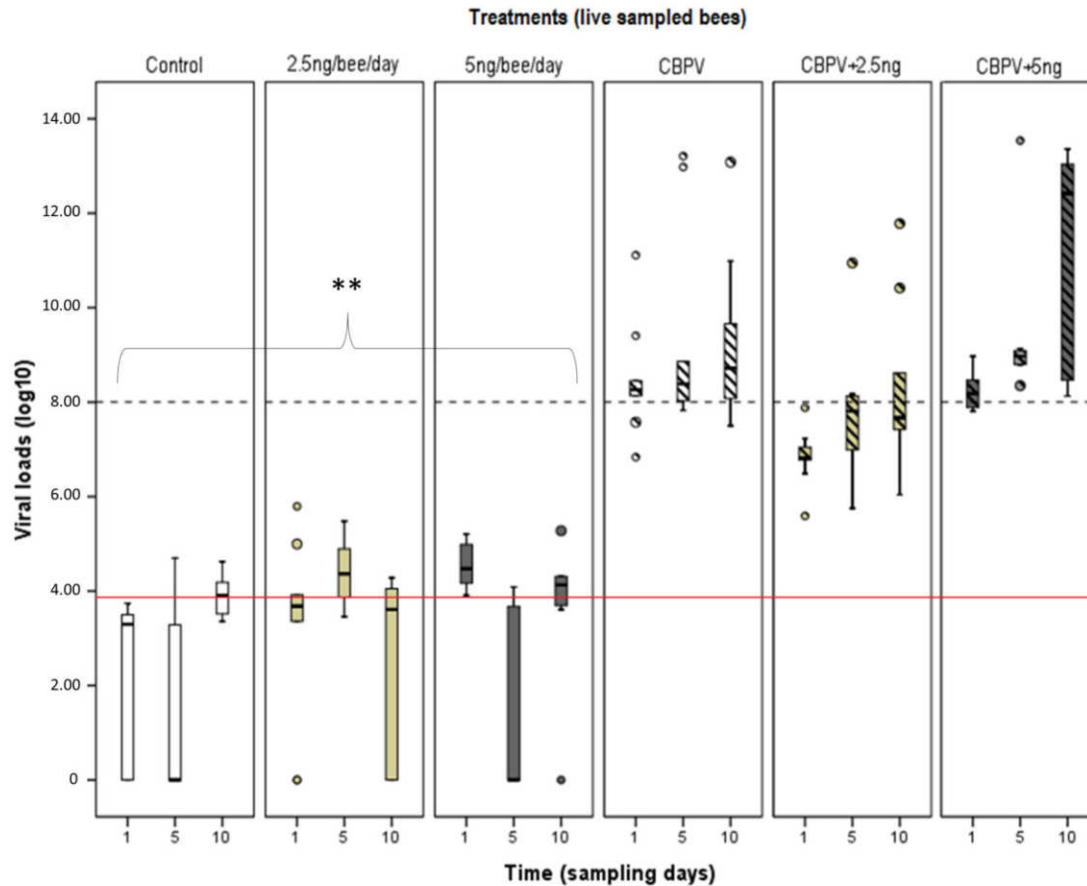


Fig 6: Distribution of the viral loads quantified in live honeybees from the co-exposure experiment (n=9 for each condition and day). White boxes: control bees, light grey boxes: 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam, dark grey: 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam; hatched: contact with CBPV-sick bees. The dotted line represents “infection threshold” (10^8 copies/individual) over which infected honeybees are likely to develop clinical signs of the CBPV disease (Chevin et al., 2012) and the full red line represents the PCR LOQ ($10^{3.9}$ copies per individual). Box-plots show the distribution of populations, with first quartile (25%), median (50%), and third quartile (75%) (boxes), minimum and maximum (whiskers) and outliers (circles). Stars show significant difference in viral-load between no CBPV and CBPV exposed honeybees (**: $p < 0.01$).

3.2.2. Viral loads

The distribution of the CBPV loads is shown in Figure 6 and 7. Viral loads in the unmarked honeybees that were alive and sacrificed on sampling (here named “live-sampled”) differed significantly between two experimental groups: exposed and not exposed to the virus ($p<0.01$), indicating the success of our transmission method (Fig. 6). As expected, groups composed of control bees and bees exposed to the pesticide showed the lowest viral loads, mostly under or around the real-time PCR LOQ. Contact with CBPV-infected bees induced virus contamination in the tested bees (unmarked bees), regardless of pesticide exposure. There was no significant effect of co-exposure on CBPV viral loads in live-sampled honeybees ($p=0.13$), but a tendency can be seen for the honeybees co-exposed to 5 ng of thiamethoxam and CBPV. Our transmission method doesn’t allow us to control the virus doses, and this exacerbates individual variability.

The only significant effect that was observable in dead bees was on day 5 and 10, where dead bees co-exposed to CBPV and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam had higher CBPV loads than live-sampled bees in the same condition ($p<0.01$; Fig. 7).

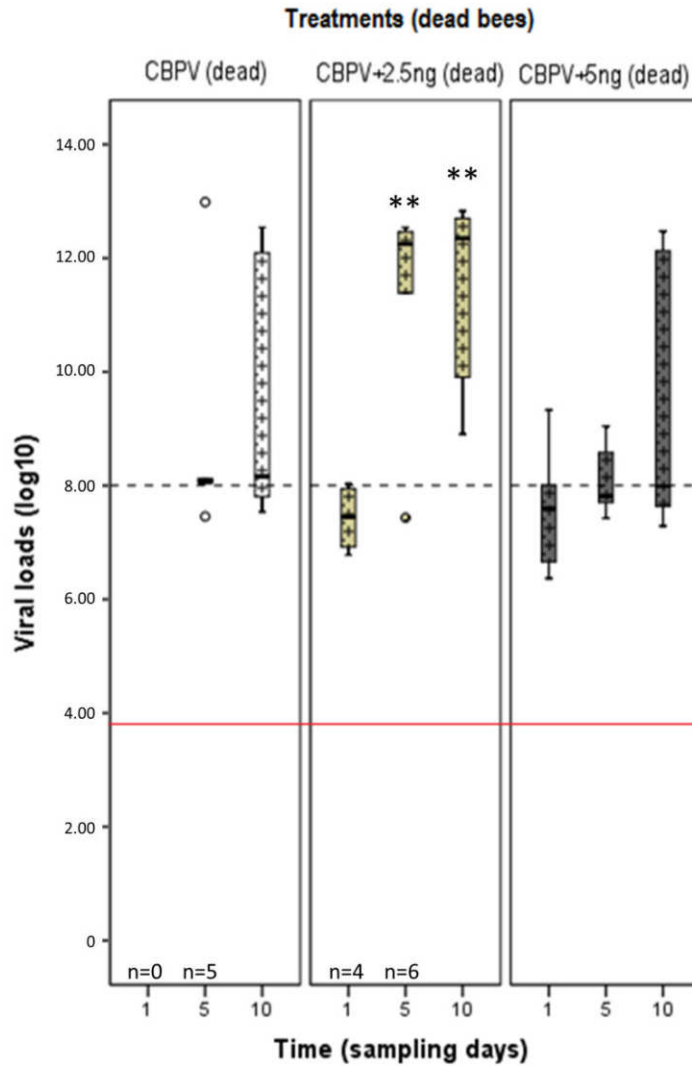


Fig. 7: Distribution of the viral loads quantified in the dead honeybees at each sampling day from the co-exposure experiment. Nine honeybees were sampled for each condition and day except otherwise stated on the graph. White boxes, crossed: contact with CBPV-sick bees; light grey boxes: CBPV and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam, dark grey: CBPV and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam (only those in contact with CBPV-infected bees are shown; there was not enough mortality in the other conditions). The dotted line represents “infection threshold” (10^8 copies/individual) over which infected honeybees are likely to develop clinical signs of the CBPV disease (Chevin et al., 2012) and the full red line represents the PCR LOQ ($10^{3.9}$ copies per individual). Box-plots show the distribution of populations, with first quartile (25%), median (50%), and third quartile (75%) (boxes), minimum and maximum (whiskers) and outliers (circles). Stars show significant difference in viral-load found in CBPV exposed honeybees between day 1 and both days 5 and 10 (**: $p < 0.01$).

4. Discussion

In this study, we first showed that thiamethoxam is quickly and effectively metabolised into clothianidin and would be excreted by honeybees. In addition, we demonstrated that chronic co-exposure between thiamethoxam at 5 ng/bee/day and CBPV can cause a significant increase in mortality in honeybees, compared to single-factor exposure. Moreover, the pesticide and the virus showed a synergistic effect on mortality, after 8 days of exposure and beyond, at the highest tested pesticide dose (5.0 ng/bee/day). Because CBPV is often detected in apiaries (Laurent et al., 2015; Tentcheva et al., 2004), and thiamethoxam is used on common crops that are very attractive to honeybees, such as oilseed rape (Simon-Delso et al., 2015; van der Sluijs et al., 2013), this type of co-exposure to two stress factors is likely to occur in the field.

Before investigating the stress factor interactions, we assessed the metabolisation of the thiamethoxam in honeybees (Fig. 2). Thiamethoxam is known to be readily metabolised by plants and *Lepidoptera* into its main metabolite, clothianidin (Nauen et al., 2003). To our knowledge, there was no data on the fate of thiamethoxam in the case of a chronic, long-term exposure in honeybees, such as could happen if pesticide contaminated pollen or nectar is stored in the hive. Our results not only demonstrated that thiamethoxam is rapidly metabolised into clothianidin, but also revealed that metabolisation accelerates over time, as the thiamethoxam levels remained stable over 10 days but then decreased slightly even though bees were continuously fed with 10 µg/L solutions of thiamethoxam-contaminated syrup. Syrup intake is steady through the experiment, even slightly increasing over time, which further underlines this acceleration. Honeybees may have been investing more of their resources in the metabolisation process as time went by, mobilising more energy on this task (du Rand et al., 2015). In addition, the syrup intake did not decrease after 10 days, but was significantly higher in the thiamethoxam groups compared to controls (Fig. 1). This finding concurs with previous results (Kessler et al., 2015; Thompson et al., 2015) that showed that honeybees are not repelled by thiamethoxam and even consume higher amounts of syrup contaminated with the pesticide. This increased intake could also be explained by the aforementioned increased mobilisation of energy resources (Rand et al., 2015).

We also observed that clothianidin accumulated in honeybees over the course of the experiment, reaching up to four times the daily amount of ingested thiamethoxam (Fig. 2). The purpose of metabolism is to make xenobiotic molecules less toxic, as well as easier to excrete (Xu et al., 2005). However, honeybees kept in cages cannot carry out cleansing flights. If clothianidin accumulated in the rectum, this metabolite would normally be excreted during cleansing flights (du Rand et al., 2015; du Rand et al., 2017; Winston, 1987). We thus hypothesised that this growing amount of clothianidin was not accumulating in the body of the honeybees but in the rectum. The amount of clothianidin found in the dissected samples was significantly (about five-fold) lower than in the whole honeybees (Fig. 3). This result shows that the clothianidin produced as a result of metabolism of thiamethoxam would mostly be excreted, in field conditions. Moreover, the metabolite probably cannot be reabsorbed through the rectum, which is cuticle lined, making it impermeable to nicotine and nicotine-derived metabolites (du Rand et al., 2017). Our results on thiamethoxam metabolism suggest that the interaction we observed in the following experiment was not caused by clothianidin; and either comes from the thiamethoxam itself or from the pesticide metabolism process.

To minimise the amount of stress applied to our tested honeybees, and mimic insofar as possible natural conditions, we developed a CBPV-transmission process based on the direct contact route (Rivière et al., 2010). A preliminary experiment showed that this transmission process was effective, because previously healthy honeybees showed CBPV viral loads that were significantly higher than viral loads from control bees (data not shown). In the case of CBPV, this viral-transmission process can replace the usual technique of injecting a purified virus solution into CO₂-anesthetised bees. Such anaesthesia exacerbates handling stress and impacts long term survival (Rueppell et al., 2017). In order to reduce the natural viral-contamination of honeybees but with the aim to reproduce field conditions, we experimented on 9-days old honeybees. Ten days after the beginning of our experiment of co-exposure, the tested honeybees reached the age at which the honeybees are or become foragers in natural conditions, and thus are on the front line of thiamethoxam exposition through nectar and pollen collection (Clément et al., 2011).

The synergistic effect on bee survival observed between CBPV and thiamethoxam (Fig. 4 and 5) occurred only at the highest pesticide dose (5.0 ng/bee/day of thiamethoxam). As 5.0 ng/bee equates to a concentration of 200 ng/g in syrup in our experimental design, this dose is

higher than what is usually found in the field. Previously studies found a maximum of 13.3 ng/g of thiamethoxam in nectar from oilseed rape, and 86 ng/g in pollen from plants on field edges (Botías et al., 2015); 53.3 ppb (ng/g) in stored pollen (C. A. Mullin et al., 2010c); and a maximum of 20.2 ± 0.4 ng/g in honey (Barganska et al., 2013). However, the potential concentration of a given pesticide in nectar or pollen, considering the growing use of commercial thiamethoxam-coated seeds, is very difficult to predict from flowers in the field. For example, pesticide concentration in nectar and the presence of the nectar itself, can vary with multiple factors such as the position of the flower on the plant, intrinsic differences between species, varieties, or even flower to flower, meteorological conditions, time of day, soil structure and previous exposure to pesticides, differences between pulverisation and systemic pesticides, rapidity of metabolism by the plant, etc. (Aston and Bucknall, 2009). Thus, our experiment, even if not in the average range of previously found thiamethoxam concentrations, is still realistic in the current state of thiamethoxam field studies.

The 5.0 ng thiamethoxam concentration is equal to the oral 48 h LD50 concentration reported by the European Union and EFSA (EFSA, 2013; Laurino et al., 2011). In our study, the mortality of exposed honeybees only reached 50% after 9 days of chronic exposure, and after 7 days of virus co-exposure. This difference from the reported acute LD50 may arise from differences in bee genetic background between the studies (Laurino et al., 2013; Rinkevich et al., 2015; Suchail et al., 2001). In addition, detoxification mechanisms or efficiency may differ between chronic and acute exposure (Stevenson et al., 2007; Suchail et al., 2001).

Our first working hypothesis to explain the observed synergy on mortality was that thiamethoxam has a negative impact on the immune system of our tested honeybees (Di Prisco et al., 2013; James and Xu, 2012; Sanchez-Bayo and Goka, 2014), leading to an increase in CBPV viral loads, which in turn would explain the increased mortality. However, viral load varied with treatment (Fig. 6). Groups of honeybees not in contact with infected honeybees presented viral loads that were around or equal to the PCR LOQ, which represents the CBPV-load found in non-symptomatic hives in natural conditions (Blanchard et al., 2012; Ribière et al., 2007). Nevertheless, exposure to thiamethoxam alone tended to increase the median of the natural CBPV load slightly in live-sampled honeybees after 10 days for both thiamethoxam doses (2.5 and 5.0 ng/bee/day). Interestingly, exposure to thiamethoxam in these two groups appeared to decrease the variability between samples in both groups. Live-sampled honeybees from the CBPV co-exposed conditions showed a similar trend.

Interestingly, the synergistic effect of the co-exposure (Fig. 5) was not associated with a significant increase in CBPV viral loads in live-sampled honeybees (Fig. 6). However, high viral loads were detected in dead honeybees co-exposed to CBPV and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam, although the mortality rate in this group was not different from CBPV-only exposed honeybees. This viral load increase concurs with previous findings (Di Prisco et al., 2013), whereby clothianidin exposure caused an increase in DWV viral loads in co-exposed honeybees, through negative regulation of the NF- κ B factor, which is part of the honeybee immunity and seems to regulate viral loads. We therefore infer that thiamethoxam has an effect on this immune factor and that, although CBPV does not belong to the *Iflavirus* genus, CBPV multiplication may also be regulated by NF- κ B. In contrast, the co-exposure between 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV caused significantly higher mortality in honeybees (Fig. 5), but did not increase the viral loads compared with the CBPV-only exposed honeybees. This decoupling between viral load and survival in honeybees can be attributed either to the fact that the high dose of thiamethoxam killed the honeybees before the virus had time to replicate, that the detoxification processes used resources that would have been used for the CBPV to replicate, or, more hypothetically, that the presence of CBPV had a negative impact on the detoxification of the pesticide. However, this response may also be explained by a negative effect of the 5.0 ng/bee/day dose of thiamethoxam on the tolerance of individuals to the virus. Tolerance, which was initially described in plant-pathogen relationship studies and later animal models, describes mechanisms that are not directly aimed at decreasing pathogen intrusion or multiplication, but rather compensate for the energetic costs or tissue damage caused by either the pathogen or the individual's own immune response (Evans and Spivak, 2010; Medzhitov et al., 2012; Schneider and Ayres, 2008). This immune response can allow individuals to remain healthy and/or maintain good fitness even with high pathogen loads. Such alternative responses to a pathogen burden have been observed in different lineages of *Drosophila melanogaster* infected with the same strain of pathogenic bacterium (*Pseudomonas aeruginosa*), suggesting that genetic background plays a role (Corby-Harris et al., 2007). In our study, because the honeybees were strictly homogenised in all experiments, the genetic background of both honeybee groups (co-exposed to CBPV and 2.5 or 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam) could not be associated with genetic variations in tolerance. Nonetheless, exposure to the various pesticide doses may have had an impact on some physiological responses, resulting in a decrease in tolerance to the viral infection.

We demonstrated that chronic co-exposure to both CBPV and thiamethoxam, which can very possibly occur in the field, leads to a synergistic effect on mortality at a high pesticide dose (5.0 ng/bee/day). However, this synergistic effect was not reflected by an increase in CBPV viral loads, but could be explained by a negative effect of the pesticide on the honeybee's tolerance to the virus. We also highlighted the metabolism kinetics of thiamethoxam in chronic, sub-lethal doses exposed honeybees, showing that thiamethoxam is indeed converted into clothianidin in honeybees and that this clothianidin is likely to be quickly excreted in field conditions. The metabolism kinetics suggest that alternative metabolism pathways might be set up after 10 days of exposure. Further investigations on the effect of co-exposure at the transcriptional level on selected immune and detoxification-related genes will help shed more light on these novel results.

Conflict of interest statement

The authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Acknowledgements

This study was supported by “Phyto-Pharmaco vigilance” scheme (ANSES, France). We are also grateful to Carolyn Engel-Gautier, professional translator and native English speaker, for revising the paper.

Métabolisation du thiamethoxam en co-exposition avec le CBPV

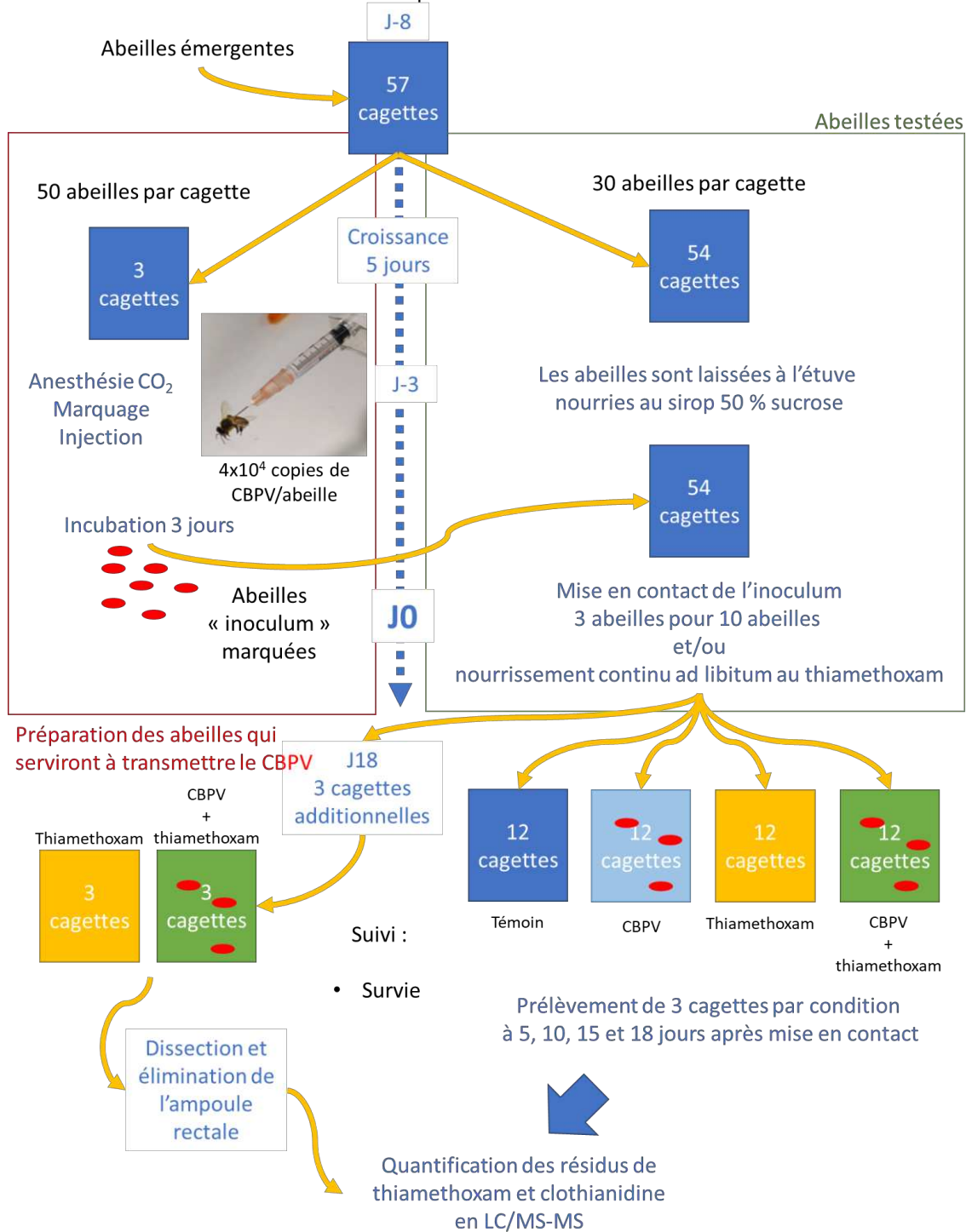


Figure 27 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de suivre la cinétique de dégradation du thiaméthoxam en clothianidine lors d'une co-exposition avec le CBPV et en conditions contrôlées.

3. Effets d'une co-exposition sur les charges virales, la transcription de gènes et la métabolisation

Afin d'approfondir les résultats obtenus lors de ces premières expériences et de tenter de mettre en lumière les mécanismes qui les causent, nous avons répétées les expériences de co-exposition, et quantifié la transcription d'une sélection de gènes, liés à l'immunité ou à la détoxification des xénobiotiques (figure 25). Pour observer si l'infection virale pourrait avoir un impact sur la cinétique de métabolisation du pesticide, nous avons également répété les dosages du thiaméthoxam et du clothianidine, en rajoutant la condition de co-exposition avec le CBPV (figure 27).

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'article en prévision d'une valorisation scientifique.

Article 2:

Chronic exposure to thiamethoxam can promote *Chronic bee paralysis virus* infections in honeybees

M. Coulon^{a, b}, F. Schurr^a, A.-C. Martel^a, N. Cougoule^a, A. Bégaud^a, P. Mangoni^a, G. Di Prisco^c, A. Dalmon^b, C. Alaux^b, M. Ribière-Chabert^a, Y. Le Conte^b, R. Thiéry^a, E. Dubois^a

^aANSES Sophia Antipolis, Unit of Honeybee Pathology, 105, route des Chappes, F06902 Sophia Antipolis, France

^bINRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, F84914 Avignon, France

^cLaboratorio di Entomologia E. Tremblay, Università degli Studi di Napoli Federico II, I80055 Portici (NA), Italy

Corresponding author: eric.dubois@anses.fr

Keywords

Neonicotinoids, metabolisation, viral loads, gene transcripts, immunity

Abstract

Co-exposure to pesticides and viruses is likely to occur in honeybee colonies. Pesticides can be present in pollen, nectar, and persist in stored food (honey and bee-bread). Viruses can spread between honeybees by contact or trophallaxis, or may be vectorised by the mite *Varroa destructor*. Here, we studied the effect of chronic co-exposure to thiamethoxam and *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) on honeybee health. No synergistic effect of co-exposure was observed on bee survival, nor on the ability of bees to metabolise the pesticide to

clothianidin. However, we found that co-exposure caused an increase in CBPV loads that reached the viral levels usually found in overt infections. The effect of co-exposure on CBPV replication was associated with down-regulation of vitellogenin and dorsal-1a gene transcription. These results could explain CBPV-related mortality peaks in single colonies or whole apiaries exposed to both stress factors.

1. Introduction

Many studies have provided concurring evidence that several stress factors, acting individually or in combination, are responsible for honeybee and other pollinator losses: loss of habitats, global warming, decreased availability of food sources, pesticide use in agriculture, and spread of parasites and pathogens (Goulson et al., 2015; S. G. Potts et al., 2010a).

Viruses are increasingly being investigated as potential causes of honeybee loss (Brutscher et al., 2016; Chen and Siede, 2007; Genersch and Aubert, 2010; Gisder and Genersch, 2015). They generally persist in honeybee populations at low viral levels without clinical signs until the emergence of overt infections. These sudden viral outbreaks are caused by unknown factors, apart from viruses that can be transmitted by the *Varroa destructor* parasites, which multiply and transmit large quantities of viruses and diminish immune barriers (de Miranda and Genersch, 2010; Di Prisco et al., 2016). At these high levels, viral infections can cause high worker mortality and/or colony losses (Chevin et al., 2012; Dainat et al., 2012a; Garrido-Bailon et al., 2010; Highfield et al., 2009).

Another factor possibly causing these viral outbreaks could be exposure to pesticides. Some pesticides have been found to impair honeybee immune response and to be linked to honeybee diseases (Sánchez-Bayo et al., 2016). This last decade, pesticides, and among them neonicotinoids, have been increasingly incriminated as one of the most dangerous factors in honeybee colony losses (Efsa, 2013; Pisa et al., 2014; Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Some interactions between viruses and neonicotinoids have already been reported. Increased mortality in honeybee larvae with high viral loads of *Black queen cell virus* (BQCV) has been found when these virus-infected bees were co-exposed to sublethal doses of thiacloprid (Doublet et al., 2015a). Significant increases in *Deformed wing virus* (DWV) loads have also

been found in honeybees co-exposed to the virus and clothianidin (Di Prisco et al., 2013). The authors of this paper also discovered that the honeybees could no longer control the viral replication because the transcription of the dorsal-1a gene, an NF- κ B effector protein involved in the Toll pathway (Brutscher et al., 2015), was inhibited by the effect of clothianidin on another effector of this pathway (leucine-rich repeat - LRR).

In order to study the factors triggering the transition from covert to overt viral infections in honeybees, we performed co-exposure experiments with the *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) and the neonicotinoid thiamethoxam.

CBPV, which causes chronic bee paralysis (Bailey et al., 1963), is not yet classified, but shows similarities to the *Nodaviridae* and *Tombusviridae* families (Olivier et al., 2008). Its genome is made up of two segments of single-stranded RNA in a non-enveloped anisometric capsid (Youssef et al., 2015). This virus has been found to be transmitted horizontally by contact between healthy and sick bees in the hive (Ribière et al., 2007). Aside from the hairless black body symptom known since Antiquity, tremors, paralysis, and inability to fly are the most frequent and characteristic symptoms, with a further characteristic sign being piles of dead or paralysed individuals in front of the hives (Aubert et al., 2008; Ribière et al., 2010). However, confusion with symptoms of pesticide intoxications (Johansen, 1977) could occur (Ribière et al., 2010). CBPV has been shown to have neurotropism, and was observed to be present in the mushroom bodies of infected honeybees, which could cause the specific nervous symptoms (Olivier et al., 2008). In one study, CBPV was detected in 28% of apiaries in France (Tentcheva et al., 2004), but only 2% of colonies were reported to show clinical signs of the disease (Laurent et al., 2015). CBPV has different prevalence rates across Europe, with a prevalence of 10% of tested colonies in Austria (Berényi et al., 2006) and none in Hungary (Forgách et al., 2008). Natural outbreaks occur sporadically, more frequently in the spring and summer (Ribière et al., 2010). Viral loads found in bees from symptomatic colonies are significantly higher than in bees from asymptomatic colonies (over 10^8 genome equivalent per bee) (Blanchard et al., 2007). Bailey et al. (Bailey et al., 1963) suggested that overt disease occurs when bee resistance is diminished.

Thiamethoxam is a neonicotinoid insecticide commonly used around the world on oil-seed rape, a crop that is widespread and attractive to honeybees (Simon-Delso et al., 2015; van der

Sluijs et al., 2013). This pesticide has been reported to be present at various doses in the honeybee environment, with for example concentrations reaching 13.3 ng/g in nectar from oil-seed rape, and 86 ng/g in pollen from field margin plants (Botías et al., 2015). It has also been detected in hive matrices, at a maximum of 20.2 ng/g in honey (Barganska et al., 2013), and 53.3 ng/g in stored pollen (C. A. Mullin et al., 2010c). Neonicotinoids bind with high affinity to acetylcholine receptors, altering neuronal signals, which leads to paralysis and death of the insects (Nauen et al., 2003). At sublethal doses, it can have negative effects on homing flights in foragers (Henry et al., 2012), and olfactory memory and learning (Yassine Aliouane et al., 2009). Chronic exposure has been shown to damage the brain and gut of Africanized honeybees (Catae et al., 2014; Oliveira et al., 2014). Thiamethoxam is quickly and readily metabolised to clothianidin, which is also marketed as an insecticide (Nauen et al., 2003). Clothianidin shows a similar effect to thiamethoxam on insect acetylcholine receptors, and has also been found to inhibit the honeybee immune system, which in turn can promote the replication of DWV (Brandt et al., 2016; Di Prisco et al., 2013).

In order to study the effect of co-exposure to CBPV and thiamethoxam, which is likely to occur in the field, we examined the mechanisms of the interaction in honeybees. We monitored the impact of both stressors separately and in combination on honeybee survival and viral loads, after 10 days of chronic exposure to thiamethoxam (oral exposure) and to CBPV-infected honeybees (contact exposure). We also selected three genes that are part of immune pathways: dorsal-1a, an effector of the NF- κ B pathway which can lead to the production of antimicrobial peptides (AMPs); apidaecin (also involved in AMP production); and prophenoloxidase (ppo) from the melanisation pathway (Boncristiani et al., 2013; Di Prisco et al., 2013; Simone et al., 2016). Finally, we selected three genes that play a role in detoxification processes: glutathione-S-transferase 3 (GstS3), catalase and CYP6AS14 (Boncristiani et al., 2012; Mao et al., 2011). Based on the results obtained concerning these genes, we also investigated whether CBPV infection could impair thiamethoxam metabolism to clothianidin, by carrying out a kinetic analysis.

2. Materials and Methods

2.1. [Winter-born honeybees](#)

Experiments were performed with honeybees (*Apis mellifera*) obtained from three colonies previously tested negative for CBPV, *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Sacbrood virus* (SBV) and DWV, located at the ANSES Sophia Antipolis laboratory winter apiary (Youssef et al., 2015), in February 2016 and March 2017 (Experiments 1 and 2, respectively). In 2016, colonies in the winter apiary were fed with 50% sucrose syrup prepared in our laboratory from pure sucrose (D⁽⁺⁾-sucrose, Acros Organics, Fisher Scientific, USA) and water, and protein paste, also prepared in our laboratory from candy sugar (Apifonda, Südzucker AG, Germany), fructose syrup (Fructoplus, Icko-Apiculture, France), *Saccharomyces cerevisiae*, and a commercial mix of supplemental *S. cerevisiae*, ascorbic acid, and various proteins and minerals (Apifeed, SINTAL, Italy). Both experiments were based on the same protocol in order to study the influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on bee survival, virus loads and physiology (Experiment 1), and on pesticide metabolism (Experiment 2). Frames containing late-stage pupae were collected and placed in an incubator overnight at 34°C. Emerging bees were pooled to minimise colony-born bias and distributed into cages: 30 bees per cage of about 780 cm³ (Pain, 1966), with a capacity of 100 bees. Cages were maintained at 34°C in incubators with saturated humidity, and bees were fed *ad libitum* with one feeder containing 50% sucrose syrup, a second feeder containing 50% sucrose syrup supplemented with 1% protein (Provita'Bee, ATZ Diététiques, France), and a third containing crystallised sugar paste. All feeders were available continuously for 9 days after emergence. Once the experiment began, feeders containing candy and syrup with protein were removed. Only the 50% sucrose syrup feeders, supplemented with thiamethoxam or not depending on the conditions, were provided to the honeybees.

2.2. [Honeybee CBPV exposure](#)

In order to reproduce natural transmission of CBPV, viral exposure was performed by contact between experimental honeybees and previously CBPV-inoculated honeybees. Five-day-old bees were inoculated with the CBPV strain A-79P (accession numbers: EU122229.1 and EU122230.1), according to the previously described protocol (Youssef et al., 2015). After 4 days of incubation, 5 to 9 CBPV-infected bees (depending on the difficulty of obtaining a

high number of bees of the same age) were marked and used to propagate the virus to nine-day-old honeybees (30 healthy honeybees per cage). A preliminary experiment had shown that both proportions of infected bees per cage had comparable effects on survival and viral transmission ($p>0.05$; data not shown). The injected bees (marked bees) died within the first three days, but were not removed, to continue propagating the virus.

2.3. Honeybee thiamethoxam exposure

To carry out pesticide exposure, a standard solution of thiamethoxam at 100 mg/L (prepared in water) was diluted in 50% sucrose as previously described (Coulon et al., n.d.), to obtain the final concentrations of 10 µg/L, 100 µg/L and 200 µg/L, corresponding to the expected daily doses of 0.25, 2.5 and 5.0 ng/bee, respectively. These doses were considered to be field-relevant, on the basis of the previously cited thiamethoxam concentrations found, and considering that it is very difficult to predict or measure a repeated amount of pesticide in nectar or pollen, due to the way in which biotic and abiotic factors act on the production of the flower (Aston and Bucknall, 2009).

2.4. Experiment 1: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on bee survival, virus loads and physiology

After nine days of growth for emerging honeybees, feeders were removed and replaced by only one feeder containing either 50% sugar syrup or 50% sugar syrup supplemented with thiamethoxam, according to the following six conditions (eight cages per condition): *i.* Control bees (bees not exposed to CBPV nor to thiamethoxam); *ii.* Bees in contact with CBPV-infected bees (five CBPV-infected bees as inoculum per cage); *iii.* Bees fed with 10 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup (about 0.25 ng/bee/day); *iv.* Bees fed with 200 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup (about 5.0 ng/bee/day); *v.* Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam; and *vi.* Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam.

Feeders were changed and weighed and survival was monitored daily (unmarked dead bees were removed from the cages). The volume consumed per bee was estimated taking into account the number of surviving honeybees per cage. At days 5 and 10 post-exposure, bees

from four cages per condition were sampled in liquid nitrogen and stored at -80°C for testing of gene transcription levels and viral load analysis.

2.5. [Experiment 2: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on pesticide metabolisation](#)

Nine-day-old bees were exposed or co-exposed to CBPV and/or thiamethoxam in the same way as previously described but in the following conditions for Experiment 2: *i.* Control bees; *ii.* Bees in contact with CBPV-infected bees (nine CBPV-infected bees as inoculum per cage); *iii.* Bees fed 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam; and *iv.* Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam. Feeders were changed and weighed and survival was monitored daily. After 1, 5, 10, 12, 15, and 18 days post-exposure, bees from each condition were sacrificed to analyse pesticide residues over time: bees from one cage for Control and CBPV conditions, and bees from three cages for the 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam and the 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam/CBPV conditions. At day 18 post-exposure, bees from three additional cages were sacrificed for each condition containing pesticide exposure. These bees were anaesthetised using CO₂ gas, and then dissected to remove their rectum, where the pesticide residues might accumulate (Coulon et al., n.d.). Samples were stored at -20°C until chemical analysis.

2.6. [Quantification of thiamethoxam and clothianidin](#)

Neonicotinoid residues in samples (one sample: 20 whole bees or 20 dissected bees) were quantified using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), according to the protocol described by Martel *et al.* (Martel and Lair, 2011). Briefly, the pesticides were extracted using acetonitrile and liquid partitioning with *n*-hexane. One clean-up was then performed on a florisil cartridge (1 g, 6 mL) and the extract was analysed by LC-MS/MS.

2.7. [Quantification of virus and gene expression levels](#)

Eight bees were randomly selected from each experimental condition (sampling of two bees per cage) at day 10 after the beginning of the treatments. Viral RNA was extracted and CBPV

loads were measured in each individual honeybee by quantitative PCR following the protocol described by Schurr *et al.* (Schurr et al., 2017). The viral loads were expressed in decimal-logarithm (\log_{10}) of CBPV genome equivalent per bee (copies/bee).

Eight additional honeybees were randomly selected from each experimental condition, and total RNA was isolated from each individual bee using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration and purity of total RNA were assessed by spectrophotometry (Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader; Thermo Fisher Scientific, USA) before being adjusted to the final concentration of 500 ng/ μ L of RNA.

The expression levels of immune genes (vitellogenin, dorsal-1-a, apidaecin, prophenoloxidase [ppo]) and detoxification genes (glutathione-S-transferase 3 [gst3], catalase and cyp6as14) were assessed using a StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) based on a SYBR green detection method. The cycle threshold values of selected genes were normalised to the geometric mean of the housekeeping genes β -actin and RpL32. Relative gene transcription data were analysed using the $2^{\Delta\Delta Ct}$ method. To verify that the amplification efficiencies of the target and reference genes (β -actin and RpL32) (Reim et al., 2015) were approximately equal, amplifications of five 10-fold dilutions of the total RNA sample (from 1,000 to 0.1 ng per reaction) were analysed in triplicate. The efficiency plot for Log input total RNA vs. ΔCt curve had a slope lower than ± 0.1 .

Amplifications were performed with the following thermal cycling profiles: one cycle at 48°C for 15 min for reverse transcription, one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min, and one cycle at 68°C for 7 min, using the Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). All primer pairs were designed using PrimerExpress 3.0 software (Life Technologies, USA) following the standard procedure. Negative (H_2O) and positive controls (previously identified positive samples) were included in each qRT-PCR run.

2.8. [Statistics](#)

Survival was established using a Kaplan-Meier estimation (Efron, 1988; Pepe and Fleming, 1989), and curves compared with log-rank tests (Bland and Altman, 2004). Synergistic

interactions were tested using a χ^2 of compliance test comparing survival measurements obtained for each day with the corresponding calculated expected measurements (Aufauvre et al., 2012; Mcvay et al., 1977). Log_{10} -transformed viral loads were analysed using a one-way ANOVA test followed by post-hoc *t*-tests or Tukey HSD tests (Miranda et al., 2013) or Kruskal-Wallis tests, followed by Wilcoxon pairwise tests with Bonferroni correction if data were not normally distributed (significant Shapiro-Wilk test). For gene expression analysis, the fold change in ΔCt was calculated using the $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ method using control conditions as the basic reference. Transcription differences were compared using the ΔCt obtained and ANOVAs followed by Fisher's LSD post-hocs or Kruskal-Wallis tests, followed by Wilcoxon pairwise tests with Bonferroni correction if data were not normally distributed (significant Shapiro-Wilk test).

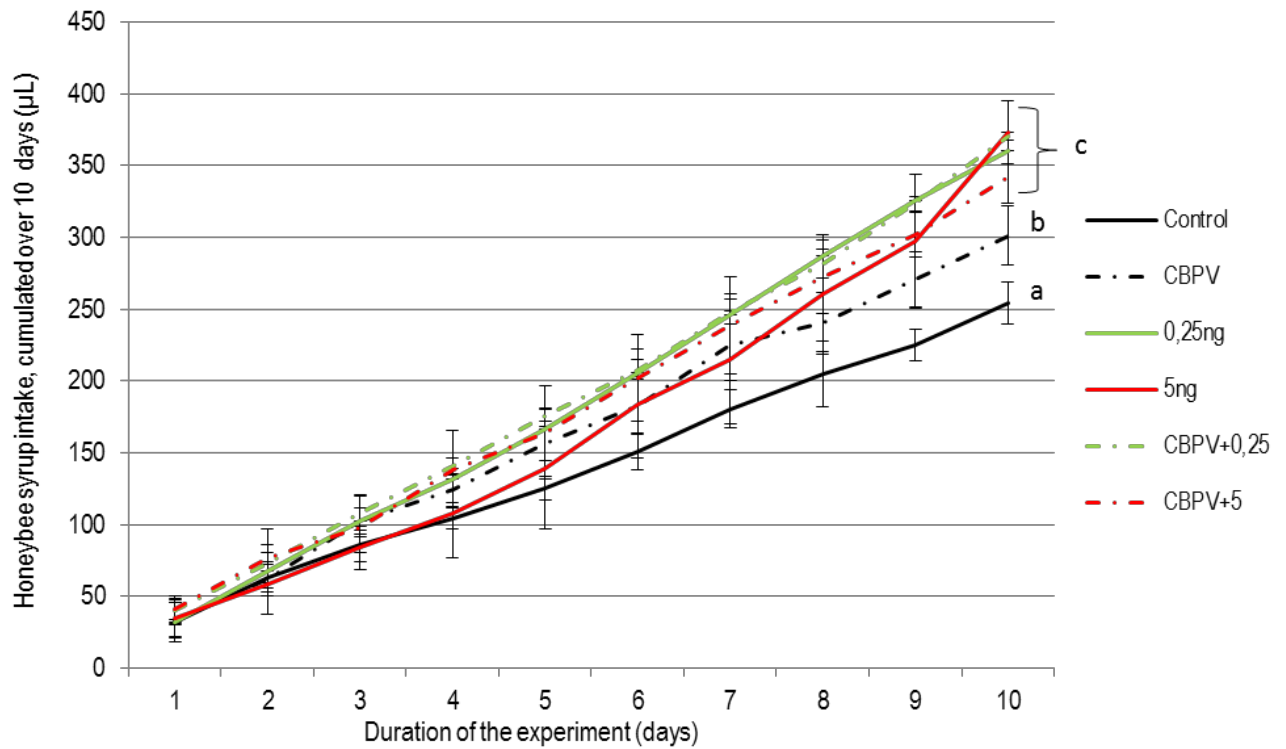


Fig. 1: Cumulated syrup intake ($\mu\text{L}/\text{bee}$) of bees exposed or co-exposed to CBPV and/or thiamethoxam. Syrup consumption is shown for each condition: Control bees, CBPV-exposed bees, Thiamethoxam-exposed bees (0.25 or 5.0 ng per bee), and bees co-exposed to CBPV and Thiamethoxam (0.25 or 5.0 ng per bee) (syrup intake is normalised considering the sampled cages and honeybee survival). Means and standard deviations of cumulated intakes are shown. The letters indicate significant differences ($p < 0.05$) found at Day 10 post-exposure or co-exposure.

3. Results

3.1. [Experiment 1: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on bee survival, virus loads and physiology](#)

a) [Syrup intake](#)

CBPV infected bees consumed slightly more sugar syrup than control bees over 10 days (at the limit of significance, $p=0.05$; Fig. 1). However, a clear increase in syrup intake was observed in bees exposed to thiamethoxam in combination or not with CBPV and regardless of the dose (0.25 or 5.0 ng) as compared to control bees ($p<0.01$ for each condition; Fig. 1). The syrup intake in thiamethoxam-exposed bees (co-exposed or not to CBPV) was also higher than in CBPV-infected bees ($p<0.01$) except for bees co-exposed to CBPV and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam ($p=0.14$).

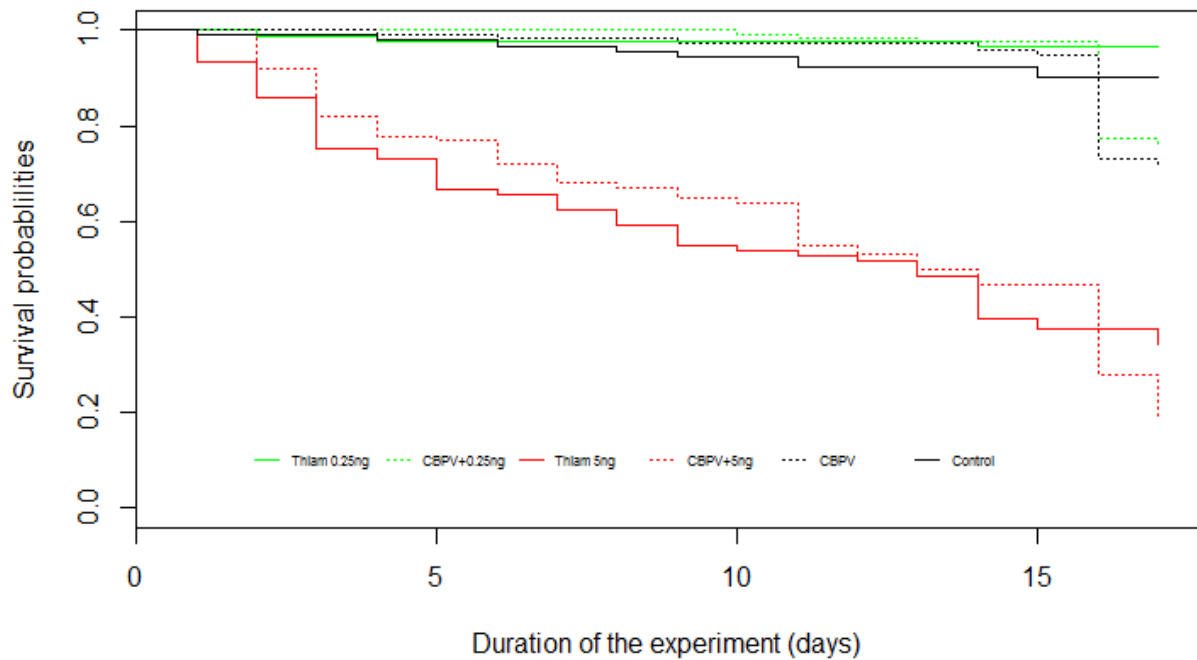


Fig. 2: Survival of bees exposed or co-exposed to CBPV and/or thiamethoxam. The survival rate is shown for each condition: Control bees, CBPV-exposed bees, Thiamethoxam-exposed bees (0.25 or 5.0 ng per bee), and bees co-exposed to CBPV and Thiamethoxam (0.25 or 5.0 ng per bee) (survival is normalised considering the sampled cages as Kaplan-Meier allows for censoring data). Letters show statistical differences between conditions (log-rank test). Three significantly different groups emerged from the statistical analysis: a) control honeybees and honeybees exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam, b) honeybees exposed to CBPV alone, and co-exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV, c) honeybees exposed to 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and co-exposed to 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV.

b) Survival

The statistical analysis of the survival rates separated the honeybees into three different groups (Fig. 2). The survival rate of bees exposed to the lower dose of thiamethoxam (0.25 ng/bee/day) was not different from that of control honeybees ($p=0.09$; Fig. 2). However, bees from both groups exhibited a better survival rate than CBPV-infected honeybees ($p<0.01$ for both conditions) and bees co-exposed to CBPV and 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam ($p<0.01$ for both conditions). Finally, bees exposed to the highest dose of thiamethoxam in combination or not with CBPV exhibited the lowest survival rate ($p<0.01$ when compared to the other conditions).

The survival rates found in the co-exposure conditions did not differ from the mortalities expected from an additive effect of CBPV and thiamethoxam exposure (for both doses; $p>0.05$).

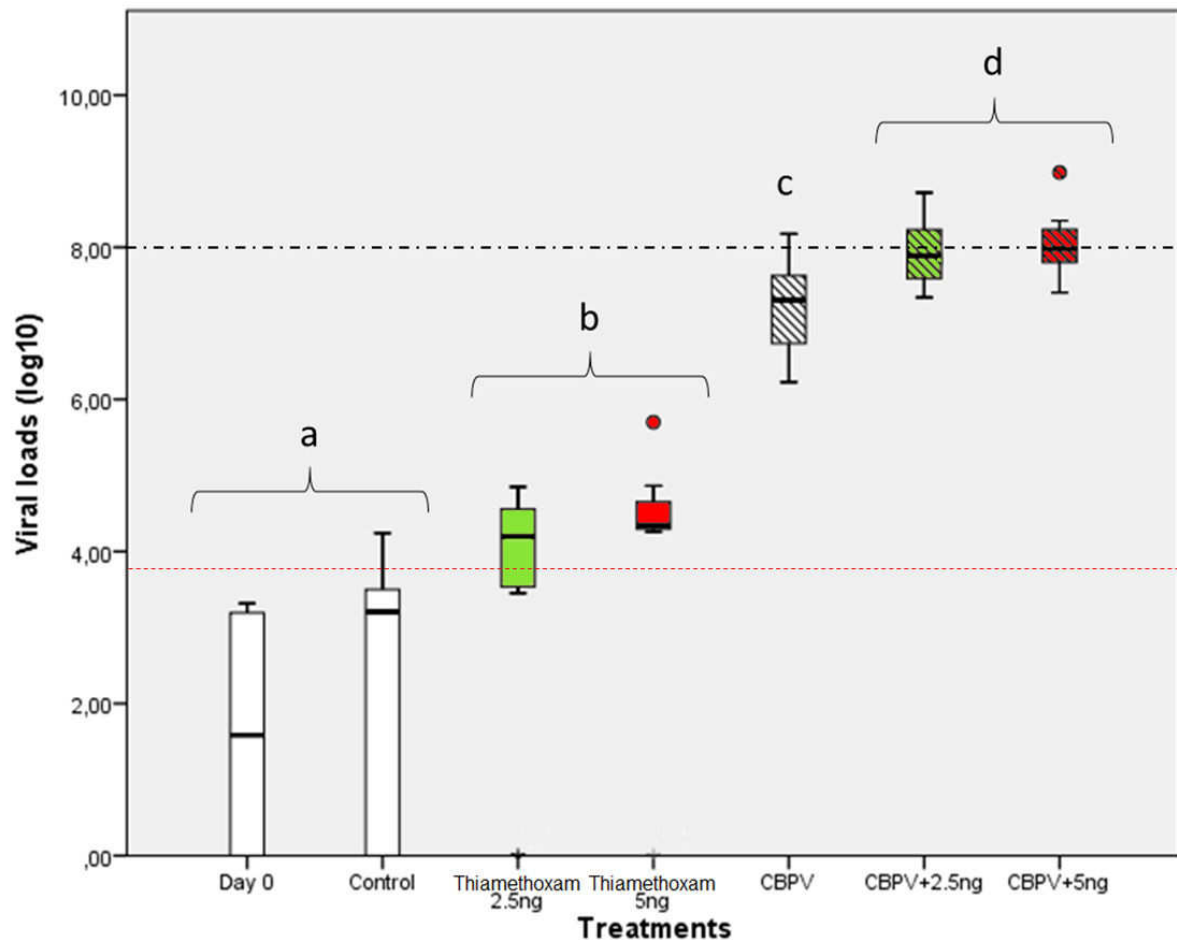


Fig. 3: Viral loads (log₁₀ of the number of copies/bee) quantified in honeybees exposed or co-exposed to CBPV and/or thiamethoxam. Day 0 corresponds to newly emerged bees, whereas other measures were performed after 10 days of exposure. The CBPV infection level is shown for each condition: Control bees, CBPV-exposed bees, Thiamethoxam-exposed bees (0.25 or 5.0 ng per bee), and bees co-exposed to CBPV and Thiamethoxam (0.25 or 5.0 ng per bee) (n = 8 bees per condition). The dashed-dotted black line represents the “infection threshold” (10⁸ copies/individual) above which infected honeybees are known to develop clinical signs of CBPV disease (Blanchard et al., 2007). Different letters show statistical differences between experimental conditions (Mann-Whitney test). Box-plots show the distribution of populations, with first quartile (25%), median (50%), third quartile (75%) (boxes), minimum and maximum (whiskers) and outliers (circles). The dotted red line shows the limit of quantification of the method (Blanchard et al., 2007).

c) Viral loads

As expected, control bees had low levels of CBPV, which were not significantly different from the levels observed in newly-emerged bees ($p=0.38$, Fig. 3). The CBPV levels of both groups were significantly lower than those encountered in bees exposed to both doses of thiamethoxam ($p<0.03$ for both groups). Exposure to CBPV-infected bees induced a significant increase of CPBV in nestmate bees, when compared to control bees ($p<0.01$), as well as bees exposed to thiamethoxam ($p<0.02$ for both doses).

Finally, the bees co-exposed to the virus and the pesticide exhibited the highest viral loads, which were significantly different from all the other conditions ($p<0.05$). In addition, for these co-exposure conditions, the CBPV levels at 0.25 and 5.0 ng of thiamethoxam reached a mean of 1.42×10^8 and 2.08×10^8 copies/bee, respectively, which was above the “infection threshold” leading to clinical signs of CBPV disease.

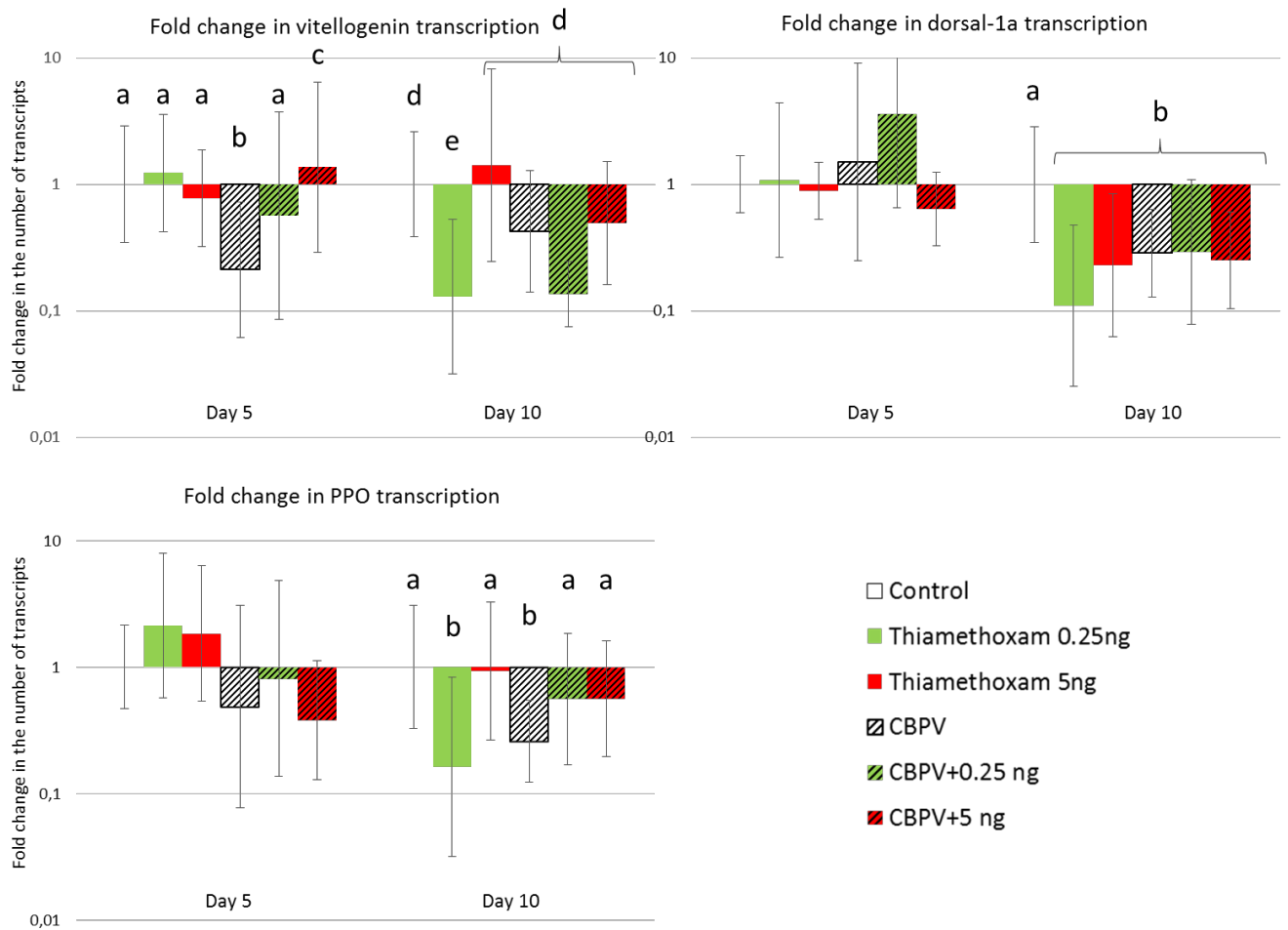


Fig. 4: Graphic representation of the fold changes in transcription for the tested immunity-related genes after exposures. The graph was built using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, at Day 5 and Day 10 after the beginning of co-exposure. Letters show statistically different groups, calculated on the basis of the ΔCt . Statistical groups are specific for each gene. No letter indicates that no statistical differences were found between the conditions ($p > 0.05$).

d) Expression level of immune and detoxification genes

The relative changes (compared to the control bees) in transcription of the six selected genes, three immune-related (Fig. 4) and three detoxification-related (Fig. 5), were measured in honeybees after 5 and 10 days of exposure to thiamethoxam, CBPV, or co-exposure to virus and pesticide. For each gene and condition, 8 individual honeybees were tested. The statistical differences between the fold change in transcription between control and exposed (or co-exposed) honeybees were considered significant at $p \leq 0.05$. The transcription level of the apidaecin gene showed no significant differences ($p > 0.05$) in any of the conditions (data not shown).

i) Effect of thiamethoxam

Compared to control conditions, thiamethoxam at the dose of 0.25 ng/bee/day significantly up-regulated transcription of the detoxification gene *gsts* 5 days after the beginning of pesticide exposure (Fig. 5, b; $p = 0.044$). It also down-regulated the catalase gene (Fig. 5, b; $p = 0.044$). After 10 days, the pesticide significantly down-regulated transcription of the vitellogenin gene (Fig. 4, e; $p < 0.01$), of the immune-related genes dorsal-1a (Fig. 4, b, $p < 0.01$), ppo (Fig. 4, b; $p < 0.01$), and of the detoxification-related genes *gst3* (Fig. 5, d, $p = 0.04$), *cyp6as14* (Fig. 5, d; $p < 0.01$), and catalase (Fig. 5, d; $p < 0.01$).

The 5.0 ng/bee/day dose of thiamethoxam significantly down regulated dorsal-1a (Fig. 4, b; $p < 0.01$) and *cyp6as14* (Fig. 5, d; $p = 0.01$), but only at 10 days after the beginning of exposure.

i) Effect of CBPV

Compared to control conditions, CBPV down-regulated catalase at 5 days after the beginning of exposure (Fig. 5, b; $p < 0.01$). The transcription of the vitellogenin (Fig. 4, b; $p = 0.01$) and *cyp6as14* (Fig. 5, b; $p = 0.03$) genes was also reduced after 5 days of virus exposure, as well as the dorsal-1a (Fig. 4, b; $p < 0.01$) and ppo (Fig. 4, b; $p = 0.02$) genes after 10 days.

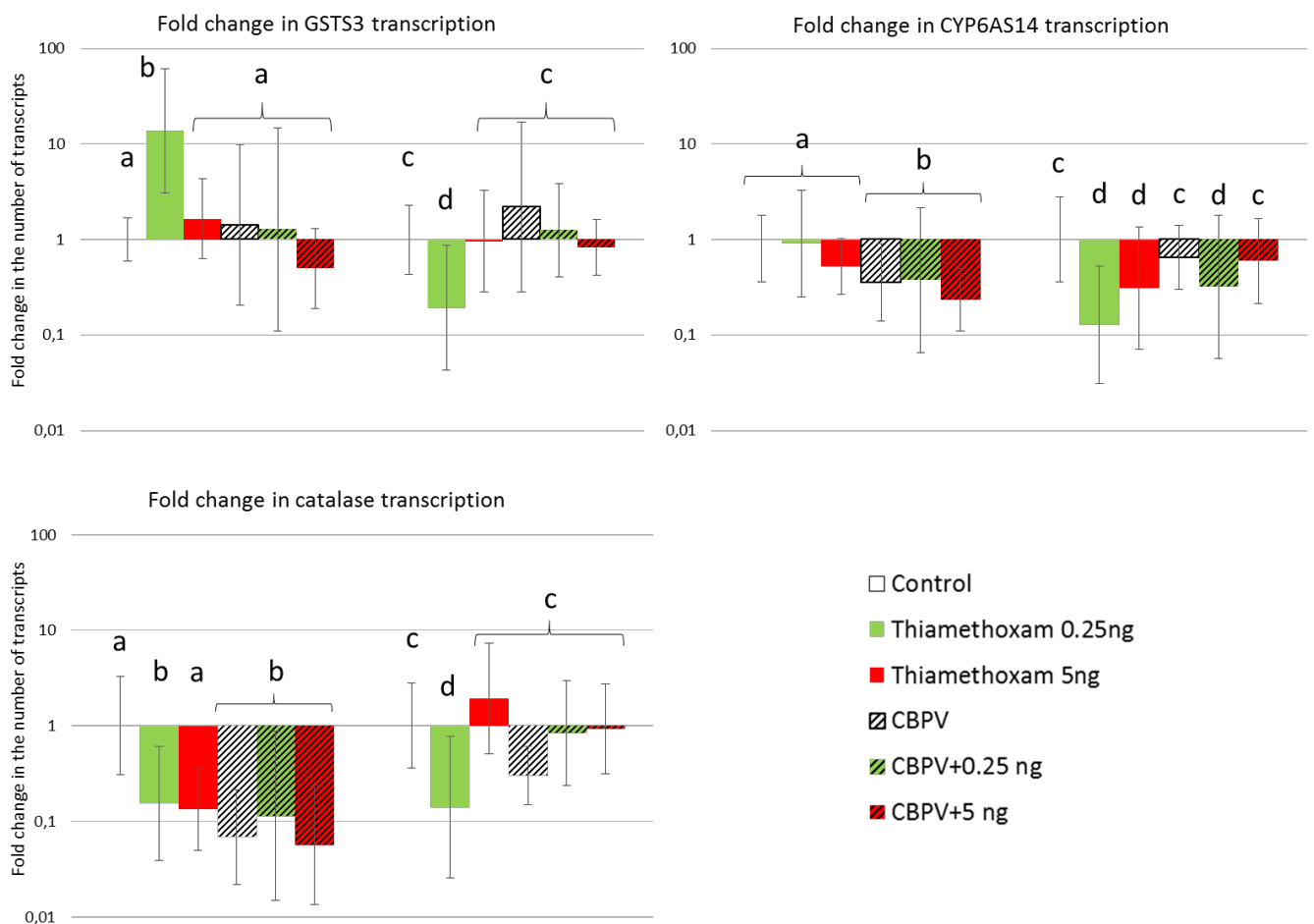


Fig. 5: Graphic representation of the fold changes in transcription for the tested detoxification-related genes after exposures. The graph was built using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, at Day 5 and Day 10 after the beginning of co-exposure. Letters show statistically different groups, calculated between the ΔC_t . Statistical groups are specific for each gene. No letter indicates that no statistical differences were found between the conditions ($p > 0.05$).

i) Effect of co-exposure

Co-exposure of honeybees to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV down-regulated catalase at 5 days after the beginning of co-exposure (Fig. 5, b; $p<0.01$), and dorsal-1a after 10 days (Fig. 4, b, $p<0.01$), compared to control conditions. In this last case, it was also different from the thiamethoxam 0.25 ng dose alone ($p=0.03$).

Compared to control conditions, co-exposure to 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam and CBPV down-regulated the transcription of vitellogenin (Fig. 4, c; $p<0.01$), catalase (Fig. 5, b; $p=0.01$), and cyp6as14 (Fig. 5, b; $p<0.01$) at 5 days after the beginning of co-exposure, and dorsal-1a (Fig. 4, b, $p<0.01$) at 10 days. After 5 days, this co-exposure also significantly reduced transcription of vitellogenin compared to thiamethoxam at 5 ng alone ($p<0.01$) and the co-exposure between CBPV and thiamethoxam at 2.5 ng ($p=0.03$).

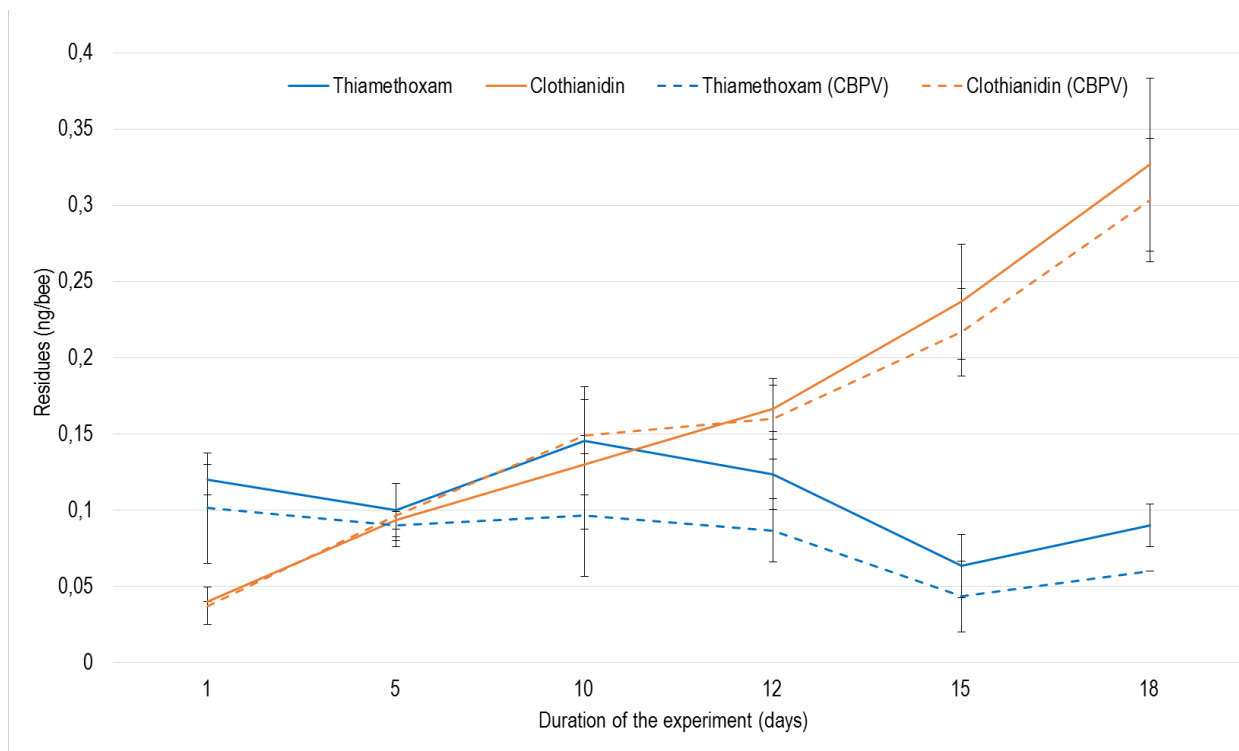


Fig. 6: Metabolisation kinetics of thiamethoxam in bees exposed to the pesticide and co-exposed to pesticide and CBPV. The metabolisation of thiamethoxam to clothianidin is shown over time in bees exposed to thiamethoxam (0.25 ng/bee/day) and exposed or not to CBPV (n=20 bees per condition). Means and standard deviations are shown.

3.2. Experiment 2: Influence of thiamethoxam and CBPV co-exposure on pesticide metabolism

a) Thiamethoxam metabolism into clothianidin

The quantity of thiamethoxam and clothianidin in honeybees exposed chronically to 0.25 ng/bee/day was assessed (Fig. 6). Levels for both neonicotinoids were under the limit of detection (LOD = 0.015 ng/bee) in control and CBPV-exposed bees over the course of the experiment (data not shown). In bees exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam, the pesticide level remained stable over the course of the experiment and under 0.15 ng/bee. In contrast, clothianidin levels increased steadily throughout the experiment, from under 0.05 ng/bee after one day of exposure to almost 0.35 ng/bee after 18 days.

No significant difference was found at any time and for any residue between the bees exposed only to thiamethoxam and bees co-exposed to thiamethoxam and CBPV.

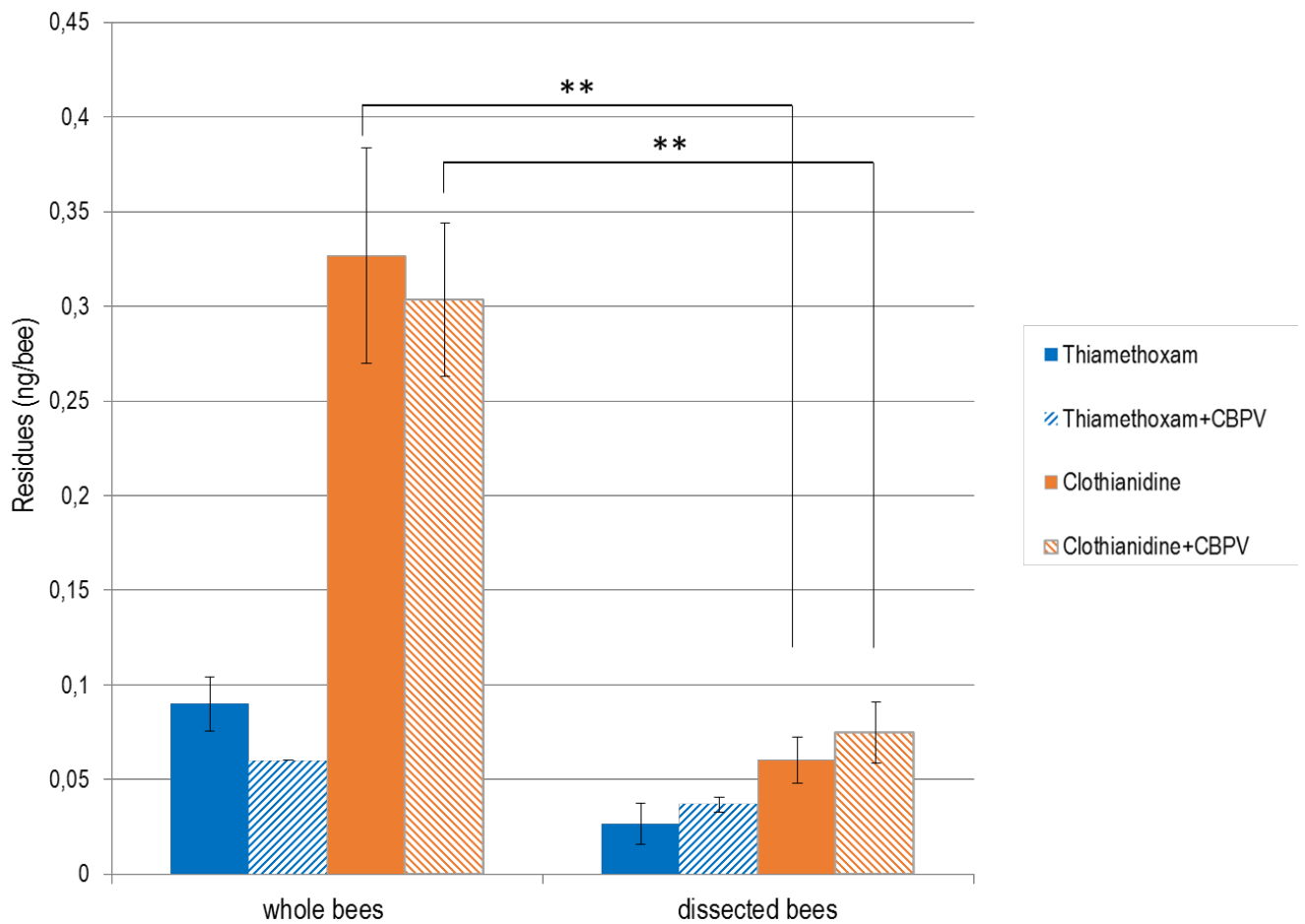


Fig. 7: Thiamethoxam and clothianidin levels in whole bees and dissected bees (n=20 bees). The levels of the pesticide (thiamethoxam) and its metabolite (clothianidin) are shown in whole bees and dissected bees (rectum excised); (**) denotes a significant difference ($p < 0.01$) between the clothianidin measurements in whole and dissected bees. Means and standard deviations are shown.

a) Pesticide residue levels in whole bees and dissected bees

Thiamethoxam levels between whole bees and dissected bees (rectum excised) did not differ significantly in bees exposed to thiamethoxam and infected or not with CBPV ($p=0.35$ and $p=0.45$, respectively; Fig. 7). Clothianidin levels were significantly higher in whole bees than in dissected bees, for both treatments ($p<0.01$). However, there was no significant difference in the thiamethoxam or the clothianidin levels between treatments, either in whole ($p=0.33$ and $p=0.59$, respectively) or dissected honeybees ($p=0.19$ and $p=0.28$, respectively).

4. Discussion

Several viruses in bees cause silent or covert infections until they progress to levels associated with more obvious pathological symptoms (Amiri et al., 2015; Aubert et al., 2008). Aside from the role of vectors such as *Varroa destructor* (Gisder et al., 2009; B Locke et al., 2012; Nazzi et al., 2012), the mechanisms underlying this transition are not well known. Here we found that, when exposed to thiamethoxam, honey bees infected with CBPV levels mimicking covert infection can develop viral infection levels known to be related to clinical signs of CBPV disease. We discuss here how co-exposure to both stress factors might affect bee health.

In this study, we observed a significant effect of thiamethoxam on syrup intake (Fig. 1), which could be explained by the honeybees attraction for the pesticide (Kessler et al., 2015). We observed the same phenomenon in a previous experiment (Coulon et al., n.d.). This phenomenon could contribute to higher exposure levels of bees to the pesticide. A similar effect was observed in CBPV-infected bees alone, but to a lesser extent. The increase in syrup consumption could be explained by a higher sugar requirement due to the energy invested in fighting the disease (Alaux et al., 2010b; Evans and Spivak, 2010) and/or in detoxification processes (Rand et al., 2015). The co-exposed honeybees (to both virus and pesticide) did not show syrup consumption higher than bees exposed solely to thiamethoxam, underlining the absence of interaction between the virus and the pesticide on this physiological trait, and diminishing the bias of higher exposure to the pesticide.

We assume that the relatively low impact of CBPV on survival (Fig. 2), lower compared to our previously reported results (Coulon et al., n.d.), could be explained by variability in reproducibility of experimental results. This variability could have three various explanations. First, the honeybees and their colonies in this experiment were kept in controlled conditions in the winter apiary. Not only were temperature and humidity controlled by keeping the colonies inside (Youssef et al., 2015), but their sources of food were also controlled. Winter apiary colonies were fed with only syrup and protein paste prepared in our laboratory which do not contain pollen or nectar. Our previous experiment was carried out in summer, with colonies kept outside and which fed by foraging for pollen and nectar (Coulon et al., n.d.). The optimal nutrition intake provided by pollen and nectar depends on weather and availability on the surrounding floral composition (Aston and Bucknall, 2009). Nutrition can have an impact on immune resistance (Alaux et al., 2010b), and it has been shown that different pollens have different effects on nurse bee physiology and resistance to the parasite *Nosema ceranae* (Di Pasquale et al., 2013) and pesticide resistance (Huang, 2012). Pathogens have also been shown to be transmitted through pollen (Higes et al., 2008b; Singh et al., 2010). A retrospective analysis of the honeybees used in our previous experiment showed that honeybees co-exposed to thiamethoxam and CBPV were also contaminated with about 10^5 copies per bees of SBV, and between 10^4 and 10^6 copies per bees of BQCV (data not shown). In the present study, the colonies kept in the winter apiary and fed with artificial food were free of SBV and BQCV (in addition, ABPV and DWV were not detected, data not shown). While the SBV and BQCV viruses are known to cause symptoms on brood (Aubert et al., 2008), little is known about the potential sublethal effects in adult honeybees. Moreover, pollen and nectar are part of the sources via which honeybees can be exposed to pesticides (Botías et al., 2015; Chauzat et al., 2006; Johnson et al., 2010; C. A. Mullin et al., 2010a), especially early in life when larvae are being fed (Desneux et al., 2007; Rortais et al., 2005). Rearing larvae in contaminated brood frames has, for example, been shown to impair emerging honeybee resistance to *N. ceranae* (Wu et al., 2012). This type of natural exposure to biotic and abiotic contaminants could not be controlled in emerging bees coming from colonies kept outside in summer.

Second, the two experiments were performed in different seasons (in winter - albeit in a winter apiary with controlled temperature for the present study, and in summer for the previous one (Coulon et al., n.d.)). Consequently, physiological differences due to developmental influences cannot be ruled out. Winter honeybees notably have larger fat

bodies and possess more vitellogenin and phenoloxidase than summer bees (Amdam, G.V., Omholt, 2002; Behrends and Scheiner, 2010; Erban et al., 2013; Seehuus et al., 2006); both proteins are known to support a stronger immune system when at high levels (Amdam et al., 2004b). Further experiments comparing for example vitellogenin transcription levels and fat body size between summer-born, winter-born and true winter honeybees could confirm this hypothesis.

Third and last, this difference between the two experiments may also arise from differences in bee genetic background between the studies (Laurino et al., 2013; Rinkevich et al., 2015; Suchail et al., 2001).

Nevertheless, viral loads in the tested honeybees increased gradually with the presence of pesticide at any dose, after exposure to CBPV, and after co-exposure to both stressors (Fig. 3). Therefore, viral loads in the co-exposure conditions could result from an interaction between thiamethoxam and CBPV, regardless of the dose. We cannot conclude whether this interaction is synergistic or additive, since overt infections are threshold-dependent (Blanchard et al., 2007). The CBPV levels in co-exposed honeybees were the only ones to exceed the number of viral copies per bee that is usually related to the development of clinical signs (10^8 CBPV genome copies per bee). This specific effect of co-exposure on bees could explain the appearance of peaks in CBPV mortality in spring, when hives are highly populated. Importantly, covert CBPV infection (Aubert et al., 2008; Tentcheva et al., 2004) associated with chronic exposure to lipophilic pesticides accumulated in hive matrices (Chauzat and Faucon, 2007; C. A. Mullin et al., 2010b), or brought in from the field (Botías et al., 2015; Chauzat et al., 2006; Johnson et al., 2010; C. A. Mullin et al., 2010a), might cause an overt infection leading to massive death. However, despite the significant increase in CBPV levels that was found in this study, we did not observe a synergistic effect of the virus and pesticide on short-term bee mortality.

In order to decipher the underlying mechanisms of this increase in CBPV levels after thiamethoxam exposure, we studied the expression of several genes involved in immunity and detoxification (Figs. 4 and 5). Exposure of honeybees to CBPV alone has a down-regulating effect on immune-related genes transcription, which is contrary to what could have been expected from a reaction to a pathogenic infection (Fig. 4). However, a similar effect on

vitellogenin has been observed in previous studies, caused by various stresses, including but not limited to viruses (Amdam et al., 2004a; Boncristiani et al., 2012; Bordier et al., 2017; Koywiwattrakul et al., 2005). Other viruses, such as DWV, have been found to have a down-regulating effect on dorsal-1a (Nazzi et al., 2012). We also found that the transcription regulations after five days of co-exposure to 5.0 ng/bee/day and CBPV were similar to the regulations (up or down-regulated genes) associated with CBPV alone and to the pesticides alone. After ten days, however, the responses after co-exposure corresponded only to the response found after exposure to the pesticide alone. It has been shown that, as bees age, some immune response gene transcriptions fade, and sometimes even stop completely (Bull et al., 2012; Jefferson et al., 2013). The amount of vitellogenin is also linked to ageing itself (Amdam et al., 2004b; Guidugli et al., 2005).

The experiments performed with honeybees exposed only to thiamethoxam did not show dose-dependent variations in gene transcription, but different, sometimes opposite variations (Fig. 4). For example, the lowest dose of 0.25 ng/bee/day had a significant down-regulating effect on all tested genes after 10 days of exposure, when 5.0 ng/bee/day had this effect only on a few (dorsal-1a and CYP6AS14). This differential response between two very different doses could be explained by a phenomenon known as hormesis. Hormesis can be defined as a biphasic dose-response whereby exposure to low doses of a stressor can stimulate biological processes (Cutler and Rix, 2015). However, no effect of this different response was observed on honeybee survival, nor on their CBPV viral loads. Notably, no up-regulation in vitellogenin transcription was observed, contrary to what had been found in a previous study after 72 h of exposure (Christen and Fent, 2017). However, the authors of this publication showed lower transcription of vitellogenin after 72 h compared to 48 h, which should be consistent with a possible decrease and return to the original values we observed in our measurements performed 5 and 10 days after chronic exposure to thiamethoxam.

We found that thiamethoxam down-regulated dorsal-1a and catalase (Fig. 4). The down-regulation of dorsal-1a concurs with what had already been described by Di Prisco et al. [18] with clothianidin. Here, we infer that this down-regulation occurs later compared to the experiment performed by these authors, because we used comparatively lower doses of pesticides. Moreover, thiamethoxam toxicity is slightly lower than clothianidin (Efsa, 2013; Laurino et al., 2011). The thiamethoxam 48 h oral lethal dose (LD50) has been estimated to be between 1.65 ng/bee and 9.07 ng/bee depending on the European subspecies (Laurino et

al., 2013) and up to 10.86 ng/bee for Saharan honeybees (*Apis mellifera sahariensis*). Even though metabolism of thiamethoxam to clothianidin is high (Fig. 6), we showed that most of the resulting clothianidin is excreted in the rectum (Fig. 7). In addition, this down-regulation of dorsal-1a could be linked to the rise in viral loads, and explain the higher CBPV loads in honeybees exposed to the pesticides alone than in control bees. Since we found that our collected bees were not totally free of CBPV before the experiment, the down-regulation of this immune-related gene would have allowed for this covert infection to develop into higher viral loads. Keeping in mind that CBPV is a different virus than DWV, we could still refer to Nazzi et al. (Nazzi et al., 2012), who showed that DWV down-regulated dorsal-1a, but not to the point of no transcription, allowing the remaining transcription to control the viral infection sufficiently. However, this down-regulation leaves a fragile balance that can easily be disrupted by another stress affecting the NF- κ B effector, thus allowing DWV to replicate uncontrollably and reach high infection levels. Here, we hypothesise that this could be what underlies the significant increase in background CBPV infection in bees exposed to thiamethoxam alone, and the other highly significant increase in experimental CBPV infection in co-exposed honeybees.

While we have considered catalase to be detoxification-related because of literature data (Boncristiani et al., 2012; Mao et al., 2011), its role is to protect cells from a dangerous and ubiquitous metabolic byproduct, H₂O₂ (Calabrese and Canada, 1989). Indeed, in addition to being a byproduct of xenobiotic metabolism (Calabrese and Canada, 1989), H₂O₂ is known to be produced as an innate response to viral infections in most vertebrates, including insects (Akaike, 2001; Nappi and Christensen, 2005). Therefore, the down-regulation of catalase by both stresses (pesticide and virus) was surprising (Fig. 5). Nevertheless, we found that the down-regulated transcription of the detoxification-related genes catalase and CYP6AS14 by co-exposure, has no impact on the metabolism kinetics of thiamethoxam. This underlines the fact that, in these experimental conditions of exposure, the detoxification system might be relatively more robust than the immune system. The metabolism of thiamethoxam could be effected by different enzymes or pathways. CYP450, for example, is a large family of detoxification-related enzymes, of which a number are present in the honeybee (Berenbaum and Johnson, 2015), but not all could be tested here. Further studies are needed to uncover specifically which detoxification pathways or enzymes play a key role in the detoxification of this specific neonicotinoid in bees. In this context, the use of an overall method to study gene

transcriptions such as RNA sequencing would help to develop a broader picture to shed light on the honeybee's metabolic responses to both neonicotinoid and virus treatments.

In conclusion, we showed experimentally that low doses of thiamethoxam can trigger chronic bee paralysis symptoms in covert CBPV-infected bees. This finding could contribute to a better understanding of the occurrence of colony decline or severe losses of bees.

Supplementary material

Name	Sequence (5'-3')	Amplicon length (bp)	Reference
CYP6AS14			
F	TGACATTGAGTTGACGGACGAT	64	this study
R	GAAACCTGCCGCGAAGAA		
GSTS3			
F	AAACCGATAGCGCAGAGTAACG	87	this study
R	CATCATTGCCCTCCCATTCGT		
Catalase			
F	TTTGGTGGGCCTAGAGAATGTC	92	this study
R	TCCTCCTTTGGGTCTACATCATAAC		
Apidaecin			
F	TTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	81	(Di Prisco et al., 2016)
R	GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT		
Dorsal-1A			
F	TCGGATGGTGCTACGAGCGA	153	(Di Prisco et al., 2016)
R	AGCATGCTTCTCAGCTTCTGCCT		
Vitellogenin			
F	AACGCCGTGAAGGTGAACAG	109	this study
R	TATCGTAGAGAACCTCGCATTTCC		
PPOAct			
F	CGTTGAAAAGTCGAAGCAGATTAA	112	this study
R	AGGACGCCACCGCAGTATT		
β -actin			
F	GATTTGTATGCCAACACTGTCCTT	69	(Di Prisco et al., 2016)
R	TTGCATTCTATCTGCGATTCCA		
RpL32			
F	CGTCATATGTTGCCAACTGGTTT	107	this study
R	CCATGAGCAATTCAGCACAA		
CBPV			
qCBPV9	CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC	101	(Blanchard et al., 2007)
qCBPV10	ACTACTAGAAACTCGTCGCTTCG		
CBPV S2	(6-Fam)TCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTC (Tamra)		

Supplementary Table 1: Primers used for the quantification of selected honeybee genes and CBPV.

Acknowledgements

This study was supported by the “Phyto-Pharmaco vigilance” scheme (ANSES, France). We are also grateful to Craig Marc Stevens, professional translator and native English speaker, for revising the paper.

Author contributions

Marianne Coulon, Eric Dubois and Anne Dalmon designed and developed the experiments. Nicolas Cougoule provided the honeybees. Marianne Coulon performed the experiments with technical help from Frank Schurr. Anne-Claire Martel, Adrien Bégau and Patrick Mangoni performed the LC-MS/MS neonicotinoid residue quantifications and Marianne Coulon analysed the data. Marianne Coulon and Gennaro Di Prisco performed the gene transcript quantifications and analysed the data. Marianne Coulon and Eric Dubois co-wrote the paper and Anne Dalmon, Cédric Alaux, Gennaro Di Prisco, Magali Ribière-Chabert, Richard Thiéry and Yves Le Conte reviewed and edited the writing.

Chapitre 2 :

Expérimentations in situ sur le DWV et développement d'un clone

Ce chapitre décrit les travaux effectués au laboratoire de l'INRA d'Avignon sur la co-exposition entre le thiaméthoxam et le DWV en conditions naturelles, ainsi que le développement d'outils de génétique inverse pour l'étude du DWV-A et DWV-B.

Il a déjà été observé au laboratoire un effet significatif de la molécule fille du thiaméthoxam, la clothianidine, sur le système immunitaire, qui entraînait une hausse des charges en DWV chez les abeilles co-exposées (Di Prisco et al., 2013). Nous avons également vu précédemment que le thiaméthoxam en exposition chronique pouvait dans certaines conditions causer des mortalités synergiques lorsque les abeilles étaient co-exposées au CBPV et au thiaméthoxam à forte dose (Chapitre 1, 2) ou, même à plus faible dose, causer une hausse des charges naturelles (bruit de fond) et expérimentales en CBPV (Chapitre 1, 3). Cependant, aucune expérience n'a à notre connaissance encore étudié si ces observations au laboratoire étaient applicables dans des conditions naturelles au sein de la colonie. L'exposition chronique en colonie étant difficile à réaliser, et les contaminations ponctuelles tout aussi probables, j'ai cette fois-ci utilisé des expositions aiguës au thiaméthoxam (tout comme l'avaient fait Di Prisco et al., 2013). L'exposition orale a encore une fois été choisie compte tenu de la nature systémique de l'utilisation principale de ce pesticide.

Les questions de recherches auxquelles j'ai cherché à répondre dans ce deuxième chapitre sont les suivantes :

- ✓ Est-il possible de se passer d'injection pour transmettre et étudier l'infection des abeilles par le DWV, en utilisant des infections naturelles déjà présentes ou la voie orale ?
- ✓ Quels sont les effets d'une co-exposition entre le DWV et le thiaméthoxam en doses aiguës sublétales ?

- Sur la mortalité des abeilles ?
 - Sur les charges virales en DWV et virus qui peuvent être naturellement présents dans les abeilles ?
 - Sur certains traits du comportement comme le retour à la ruche après une première sortie ou l'âge des abeilles lors de cette première sortie ?
- ✓ Les effets observés peuvent-ils être expliqués par un effet de l'un, de l'autre ou de l'interaction entre ces facteurs sur l'expression de gènes de l'immunité ou de la détoxification ?

En premier lieu, j'ai voulu étudier **l'effet d'une co-exposition aigue au thiaméthoxam** sur des abeilles dans leur colonie, tout d'abord infectées de façon naturelle, puis expérimentalement par voie orale ou injection. Lors de la deuxième expérience les entrées et sorties des abeilles étaient suivies par un compteur optique. Ces deux expériences et les résultats obtenus seront décrits sous la forme d'un article scientifique.

Dans un second temps, afin de disposer d'un outil de génétique inverse pour le DWV, **nous avons développé deux clones** correspondants au DWV-A et à un recombinant DWV-A/B en système hétérologue levure. Le développement de ces clones et les résultats préliminaires obtenus lors des tests d'infectivité sont décrits sous la forme d'un article méthodologique rédigé en anglais, bien qu'il ne puisse être publié en l'état car des essais complémentaires sont nécessaires.

1. Etudes de co-expositions thiaméthoxam-DWV en ruche

Pour étudier les effets d'une co-exposition entre le DWV et le thiaméthoxam, j'ai effectué deux expériences complémentaires.

J'ai étudié l'effet de la voie d'infection sur la charge virale en DWV. En effet, dans des conditions naturelles les abeilles peuvent être infectées horizontalement par l'alimentation ou par injection *via* l'acarien vecteur *Varroa destructor*. J'ai donc testé la co-exposition à des doses environnementales de thiaméthoxam tout d'abord en utilisant des cohortes d'abeilles infectées naturellement dans des colonies sélectionnées selon un gradient d'infection au DWV. Cette première expérience visait à tester si les augmentations de charges obtenues par Di Prisco et al., 2013 en cagette avec la clothianidine et des infections expérimentales en DWV, étaient reproductibles dans des conditions les plus naturelles possible (Figure 28).

J'ai ensuite, dans une deuxième expérience, testé une inoculation « contrôlée »c une co-exposition au thiaméthoxam. Une partie des abeilles testées ont donc été infectées par voie orale, l'autre partie par injection. Cette deuxième expérience visait à étudier les possibles effets d'une co-exposition sur des traits comportementaux, en utilisant les compteurs optiques développés par l'INRA d'Avignon et décrits précédemment dans (Alaux et al., 2014; Bordier et al., 2016), et à les relier ces effets potentiels à la transcription des gènes préalablement décrits (Chapitre 1, 3) correspondants aux voies de l'immunité ou de la détoxification (figure 29). Les résultats obtenus lors de ces deux expériences complémentaires sont présentés sous forme d'article en prévision d'une valorisation scientifique.

Des analyses complémentaires permettront d'évaluer l'impact des traitements effectués sur d'autres traits de vie, la durée et le nombre de vol effectués par les abeilles testées, par exemple. Des études ont déjà testé l'impact du DWV sur ces traits de vie, mais les résultats sont au premier abord contradictoires. D'un côté une première étude n'a pas permis d'observer d'effets du DWV seul sur la durée ni sur les vols d'orientations (Wolf et al., 2016). De l'autre, Toutefois des durées de vol de butinage plus courtes ont été observées chez des

Effet du thiamethoxam sur les charges naturelles en DWV

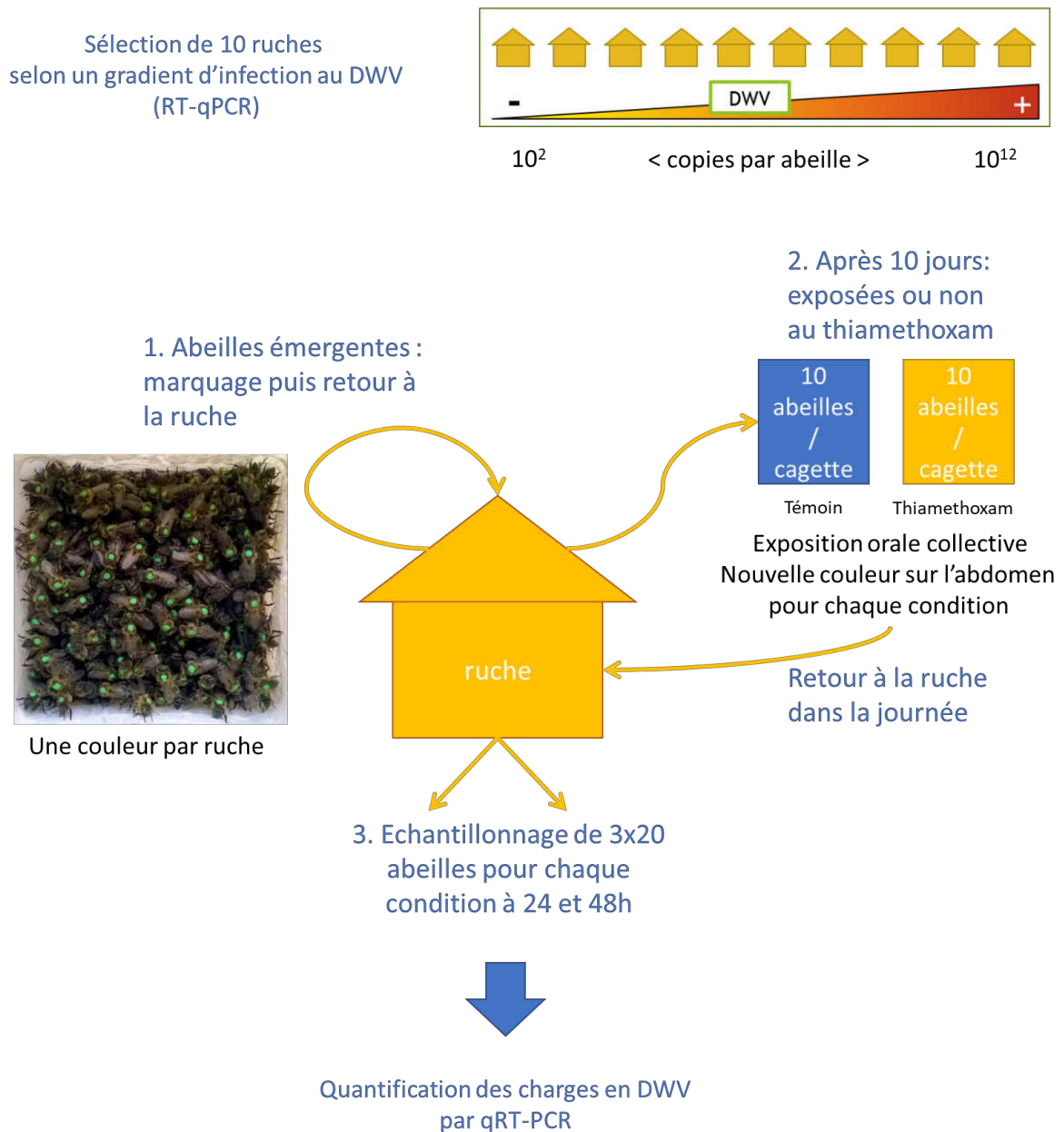


Figure 28 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de tester l'effet d'une exposition aigue au thiaméthoxam sur des abeilles provenant de colonies infectées selon un gradient de la plus faible charge en DWV à la plus élevée.

Dans chaque colonie, entre 700 et 1000 abeilles ont été échantillonnées et marquées à l'étape 1, pour obtenir environ 200 abeilles à l'étape 2. L'objectif étant d'obtenir un minimum de 3 échantillons de 20 abeilles par condition (témoin ou exposées au thiaméthoxam) et par jour d'échantillonnage (24 ou 48h après exposition).

abeilles infectées par le DWV (Wells et al., 2016). Une réduction d'activité de vol chez des abeilles ayant subi un stress immunitaire a également déjà été observée (Alaux et al., 2014).

Ainsi une analyse de nos résultats selon cet angle pourrait éclaircir ces résultats. L'élaboration de nouveaux modèles statistiques est nécessaire afin de pouvoir tester ces traits comportementaux, et elle est en cours.

Co-exposition DWV – thiamethoxam

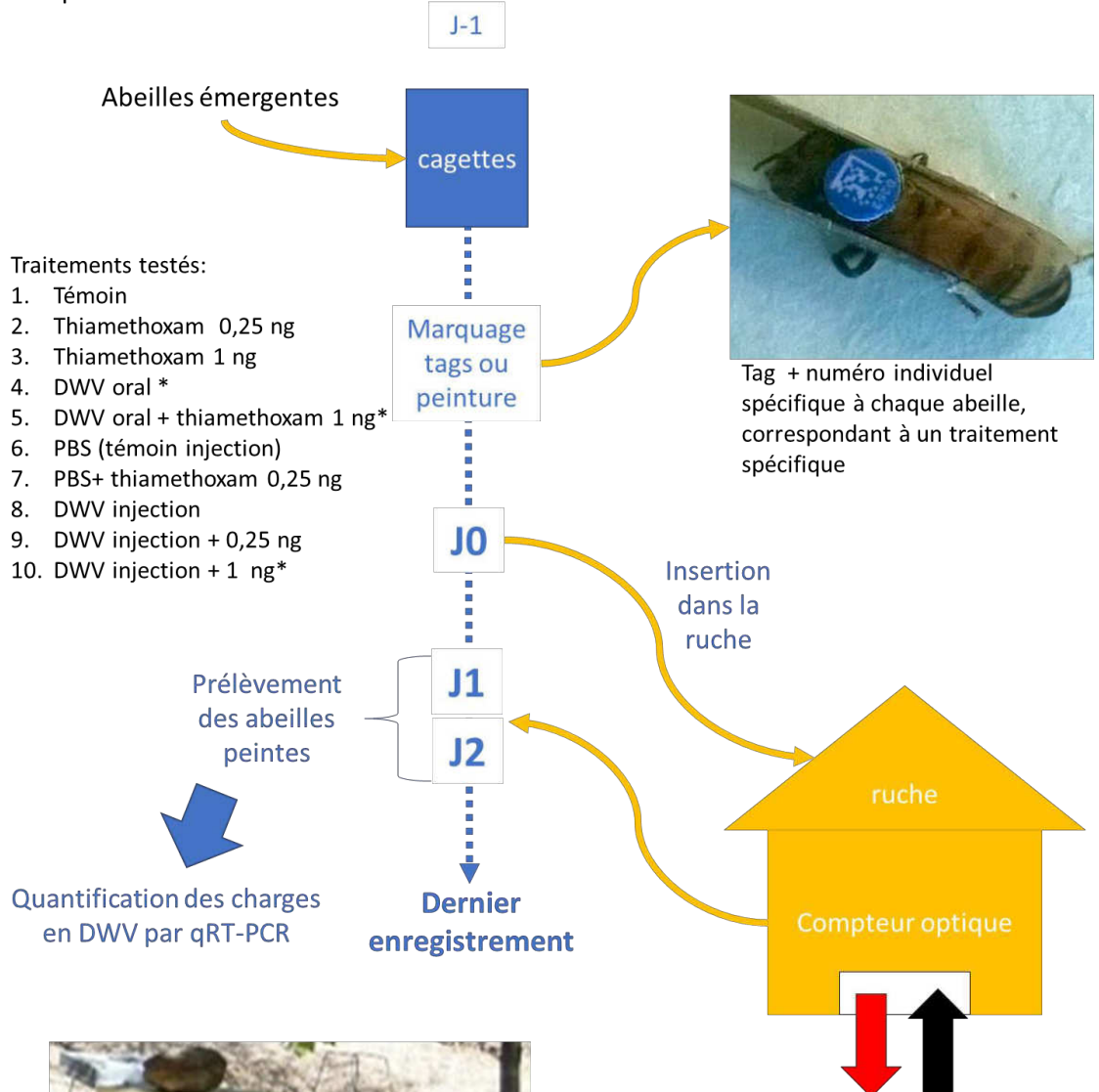


Figure 29 : Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de tester l'effet de différentes co-expositions entre le DWV et le thiaméthoxam avec des compteurs optiques.

Article 3:

Interactions between thiamethoxam and *Deformed wing virus* can drastically impair behaviour of free flying honey bees

M. Coulon^{a,b}, A. Dalmon^a, G. Di Prisco^c, A. Prado^a, F. Arban^a, M. Ribière-Chabert^b, E. Dubois^b, C. Alaux^a, R. Thiéry^b, Y. Le-Conte^a.

^aINRA PACA - UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc - F84914 Avignon - France

^bANSES Sophia Antipolis - Unit of Honeybee Pathology - 105, route des Chappes - F06902 Sophia-Antipolis - France

^cLaboratorio di Entomologia E. Tremblay, Università degli Studi di Napoli "Federico II", 80055 Portici (NA), Italy

Contact: anne.dalmon@inra.fr

Abstract

Honeybee colony declines are believed to be driven by the combination of multiple stress factors. However, little is known about how co-exposure to stress factors can alter bee survival and behavioural performances in natural conditions. We therefore studied the potential interaction between a neonicotinoid, thiamethoxam, and a highly prevalent honeybee pathogen, the *Deformed wing virus*, in colony conditions. First, we found that field-realistic doses of thiamethoxam do not increase DWV loads in infected honeybees. Then, we followed bee flight activity by using optical bee counters. We exposed bees to DWV by feeding or

injection, and/or to field-relevant doses of thiamethoxam. Contrary to oral exposure, injection of DWV resulted in increased DWV loads and reduced bee survival. A precocious onset of foraging was observed in DWV injected bees and was related to a reduction in the vitellogenin expression level. Combined exposure to DWV and thiamethoxam did not result in higher DWV loads compared to bees only exposed to DWV, but induced precocious foraging, increased the risk of not returning to the hive after the first exit, and decreased survival when compared to single stress exposures. This is the first evidence of possible deleterious interaction between DWV and thiamethoxam in natural conditions.

1. Introduction

Heavy losses of honeybee colonies in the Northern hemisphere has been documented since the beginning of the 21st century (Lee et al., 2015). It is crucial to study these losses as it is known that 84% of the 264 most important crops in Europe depend at least to some extent on animal pollination (Williams, 1994). There is now a scientific consensus on the fact that these honeybee colony losses are the result of multifactorial causes, including a decrease in floral resource availability, spread of pathogens and pesticide use (Goulson et al., 2015).

Honeybee colonies are routinely co-exposed to several pesticides and their corresponding metabolites. These pesticides are carried back to the hive via pollen and nectar. In addition, honeybee colonies are very attractive and valuable for pathogens due to the high concentration of individuals and stored food in the colony (Schmid-Hempel, 1998). Therefore, honeybees can concentrate pesticides and pathogens in their colony, and are often co-exposed to stress factors (Cornman et al., 2012; C. a. Mullin et al., 2010; Simon-Delso et al., 2014; vanEngelsdorp et al., 2009). Interactions between pesticides and pathogens have been reviewed by Poquet et al., 2016. Synergistic interactions between the microsporidia *Nosema ceranae* and a neonicotinoid or fipronil (phenylpyrazole) have been found to significantly decrease honeybee survival (Alaux et al., 2010a; Aufauvre et al., 2012; Vidau et al., 2011). *N. ceranae* infection rates increase when brood is exposed to high levels of pesticide residues (Wu et al., 2012), and imidacloprid (a neonicotinoid) has been found to increase *N. ceranae* infections in exposed colonies (Pettis et al., 2012b).

Pesticides can also interact with bee viruses. DeGrandi-Hoffman et al. (2013) showed that the number of nurse bees contaminated with *Black queen cell virus* (BQCV) increased

significantly when they were fed with pollen containing a mix of the insecticide chlorpyrifos (organophosphates) and a commercial fungicide solution (Pristine ® BASF (active ingredients: boscalid and pyraclostrobin)). Combined exposure to sublethal doses of the neonicotinoid thiacloprid and BQCV was also found to significantly increase mortality and BQCV viral loads in honeybee larvae (Doublet et al., 2015a). This latter combined effects could be explained by the immune suppression induced by the pesticide. Indeed, (Di Prisco et al., 2013) reported an inhibition of an immune cascade effector by the neonicotinoid clothianidin, which leads to the bee being unable to control *Deformed wing virus* (DWV) replication.

However, most studies on stress factor co-exposures were performed in laboratory controlled conditions. As a result, little is known about their consequences on bee behaviour, such as foraging activity. We therefore tested the potential effects of a co-exposure between a pathogen (DWV) and a common pesticide (thiamethoxam) in natural conditions. DWV is one of the most prevalent honeybee viruses in Europe; it has for example been detected in 97% of tested French apiaries in 2002 (Tentcheva et al., 2004). It is a single strand positive RNA virus, of the Picornavirales order, which gathers many of the viruses infecting honeybees (Remnant et al., 2017). However, as for many honeybee viruses, DWV mostly causes covert infection in hives (de Miranda and Genersch, 2010). Overt infections often occur when the virus is transmitted to the pupae by the Varroa destructor mite through injection while the mite feeds (de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011). Its most visible symptom is the occurrence of deformed wings. In addition, DWV infection is known to impair associative learning and memory formation (Iqbal and Mueller, 2007), cause precocious foraging trips (Benaets et al., 2017) and drastically reduce bee lifespan (Rueppell et al., 2017).

Thiamethoxam is a neonicotinoid insecticide commonly used over the world (Sanchez-Bayo and Goka, 2014), especially on oil seed rape, a crop that is widespread and attractive to honeybees (Simon-Delso et al., 2015). It can be quickly metabolized both in insects and plants into clothianidin, which is also commercialized as an insecticide (Nauen et al., 2003). Neonicotinoids bind with high affinity to the acetylcholine receptors of insects. Sublethal doses of thiamethoxam have been shown to cause negative effects on homing flights in foragers (Henry et al., 2012), and impair orientation performances of foragers in complex mazes (Fourrier et al., 2009). Furthermore, its metabolite clothianidin has been found to have an inhibiting effect on the honeybee immune system (Brandt et al., 2016; Di Prisco et al.,

2013), or to cause a significant reduction of foraging activity and longer foraging trips in exposed foragers (Schneider et al., 2012).

The maintenance of stable conditions within colonies relies on a division of labor, with bees spending the first 2–3 weeks of their adult life working in the hive (feeding and taking care of the brood, building comb), and then the rest of their life outside of the hive (foraging for nectar and pollen to supply the colony growth) (Seeley, 1995). However, a significant loss of foragers for the colony will accelerate the behavioral maturation of young bees to replace them (Robinson, 1992). Similarly, parasites also lead to precocious foragers (Dussaubat et al., 2013; Goblirsch et al., 2013; Natsopoulou et al., 2015), which may not be optimally adapted to foraging tasks (Vance et al., 2009)(Schippers et al., 2006). Altogether, loss of bees and poor performance of precocious foragers may affect the colony homeostasis and development, and ultimately lead to colony failure (loss of resilience) (Perry et al., 2015). Such parameters need then to be taken into account when assessing the influence of stress factors on bees.

We assessed in this study the influence of DWV/thiamethoxam co-exposure on bee survival and onset of foraging, as well as on the expression levels of genes involved in immunity and detoxication. We selected four genes that are part of immune pathways: *vitellogenin*, a glycolipoprotein that takes part in ageing processes as well (Amdam et al., 2004b), *dorsal-1a*, an effector of the NF- κ B pathway which can lead to the production of AMPs, the AMP *apidaecin*; and *ppo* from the melanisation pathway (Boncristiani et al., 2013; Di Prisco et al., 2013; Simone et al., 2016). We also selected three genes which take part in detoxication processes: *gsts3*, *catalase* and *CYP6AS14* (Boncristiani et al., 2012; Mao et al., 2011). For this purpose we used optical bee counters tracking individual flight activity of tagged bees (Alaux et al., 2014; Bordier et al., 2016; Dussaubat et al., 2013) and analysed the viral loads and gene expression of painted bees that had been through the same treatments.

2. Materials and methods

2.1. Experiment 1: Influence of thiamethoxam on virus loads in naturally infected bees

a) Colony screening for DWV infection

To establish a gradient of colonies infected by DWV from low ($<10^7$ copies/bee) to high ($>10^8$ copies/bee) infections (de Miranda and Genersch, 2010), we screened 24 colonies distributed in four apiaries (screening of a pool of 40 bees/colony), in mid-April 2016, through quantitative PCR. Ten colonies were selected to establish a gradient of DWV infection level, which included 5 colonies being under the “overt infection” threshold, and 5 being above this threshold. Colonies with too high a number of copies of *Acute paralysis virus* (ABPV) and/or *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) were not selected ($>10^3$ copies/bee (Amiri et al., 2015)). The 10 selected colonies were moved in a single apiary located at INRA, Avignon, France.

b) Experimental set up

Experiments were performed in June and August 2016. To obtain cohorts of bees with the same age, brood frames were collected from the hives and put in an incubator overnight at 34°C. The next day (day 0), emerging bees were collected, marked with a dot of paint on the thorax (one colour per colony), and then returned, with the brood frames, back to their own colony.

To apply thiamethoxam at an age susceptible to be linked to the first, early exposures that can occur in natural conditions, ten days later marked bees were re-collected and placed in cages, in groups of 10 bees to be exposed to thiamethoxam (early exposure that can occur in natural conditions via pollen or stored nectar (Efsa, 2013)). After 2-4 hr of starvation, bees were collectively fed with 20 µL of 30% sucrose solution containing or not thiamethoxam (99% purity, Techlab, Saint-Julien-lès-Metz, France) at the following doses: 0.25ng/bee (June) or 1ng/bee (August). A previous study showed that the solution is evenly distributed by trophallaxis between individuals (Fourrier et al., 2014). Bees were paint marked on the abdomen with a

different colour according to their treatment. One to two hours after they had eaten all the sugar solution, bees were once again returned to their colony. At day 11 (24 h post-exposure) and Day 12 (48 h post-exposure), 3 samples of 15 to 20 bees per group and colony were sampled and immediately placed into liquid nitrogen for DWV quantification.

2.2. Experiment 2: Influence of thiamethoxam and DWV co-exposure on survival, onset of foraging, and physiology

a) Experimental set up

The influence of thiamethoxam/DWV co-exposure on bee survival and onset of foraging was determined by using optical bee counters. Two colonies with 5 frames selected among the previously tested low DWV colonies ($< 2.5 \times 10^6$ copies DWV/bee) were equipped with optical counters at the hive entrance in early May 2016. Emerging bees were collected from brood frames originating from the same “DWV-low” colonies and incubated overnight at 34°C. Newly-emerged bees were distributed in cages and marked with either a 3-mm wide bar code printed on laminated paper and glued (Sader®) onto the thorax (66 bees per treatment and replicate in 2016 and 60 bees in 2017, supplementary material Table S1) or a paint mark on the abdomen (one colour per treatment, 80-100 bees per treatment and replicate, supplementary material Table S1). After marking, bees were kept overnight in an incubator at 34 °C with a saturated humidity and 50% sucrose syrup. On the next day, they were assigned to the following treatments: 1. Control bees; 2. Bees individually fed with 0.25 ng of thiamethoxam in 5 µl of syrup; 3. Bees injected with PBS (Phosphate Buffer Saline solution); 4. Bees injected with PBS and individually fed with 0.25 ng of thiamethoxam; 5. Bees injected with DWV ($\sim 10^4$ copies/bee), and 6. Bees injected with DWV ($\sim 10^4$ copies/bee) and individually fed with 0.25 ng of thiamethoxam. The experiment was replicated 5 times (in May and July 2016, and 3 between April and May 2017). The PBS injection treatments were performed as a control for the effects of the injection, as it has been shown that piercing honeybee cuticle can challenge their immunity (Alaux et al., 2014; Evans et al., 2006; Siede et al., 2012).

For the 2017 replicates (supplementary material Table S1), additional experimental groups were included: 7. Bees individually fed with an inoculum of $\sim 10^8$ copies of DWV, 8. Bees

individually fed with 1 ng of thiamethoxam, 9. Bees injected with DWV $\sim 10^4$ copies/bee and individually fed with 1.00 ng of thiamethoxam, and 10. Bees individually fed with $\sim 10^8$ copies of DWV and with 0.25 ng of thiamethoxam.

b) Thiamethoxam and DWV exposures

To obtain the DWV inoculum, an archived environmental sample of DWV-A already described (KX373899) (Dalmon et al., 2017) was injected in pupae for multiplication. After 24h at 34°C and saturated humidity, five pupae were crushed into 500 μ l of PBS then centrifuged twice for 10 min at 8,000 g and 4°C, each time collecting the supernatant, to eliminate most tissues and cell debris. Bees were injected with supernatant from the second centrifugation, and an aliquot of supernatant was later quantified using real-time RT-PCR to retrospectively assess the exact number of viral copies injected. Dilution was calculated as 2.75×10^4 copies of DWV in the 46nl of the inoculum that was injected to each bee. Injections were performed using a Nanoject (Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) and heat elongated glass microcapillary tubes, between the third and fourth tergites of bees previously anesthetized with CO₂ and maintained on ice.

Exposure to thiamethoxam was realised as follows. After 2h of starvation, bees were individually fed with 5 μ L of syrup. The 0.25 ng (2016) or 1ng doses of thiamethoxam (2017) in 5 μ l of syrup solution were obtained from successive dilutions, first in water then in 30% syrup, of a 1 mg/ml solution of thiamethoxam. Syrup was prepared by mixing 30% p/v powdered sugar in water.

The same technique was used to feed the 10^8 copies/bee of DWV for the *per os* treatments.

After treatment bees were introduced into the hives. No immediate rejection from the hive colonies was witnessed. For viruses and gene expression analysis, three samples of 3 bees per treatment (identified from their paint mark on the abdomen) were sampled in dry ice at 24 and 48 h after their re-introduction to the colony, and stored at -80°C. Bees tagged with barcodes were followed using optical counters, as previously described in Alaux et al., 2014 and Bordier et al., 2016.

c) Onset of foraging and survival

Between 60 and 66 bees per experimental group and replicate were followed with optical bee counters (for more details see Alaux et al., 2014). Briefly, the bee counter is composed of a modified entrance with eight tunnels, a camera monitoring the entrance, a computer for image acquisition and software that analyses the images and record the in-and-out activity of bees. For each detected bee, we obtained its ID, direction (in or out of the hive) and the time of activity (day, hour, minute, and second). From these raw data, we retrieved the time spent out of the hive at each exit, and identified the first day of foraging for each individual, defined as a trip lasting longer than 10 min (Benaets et al., 2017; Marco Antonio et al., 2008; Woyciechowski and Moron, 2009). All tagged bees were followed until no bee could be detected (up to 51 days ; for each bee the last detection being considered as time of death).

2.3. Virus and gene transcription quantification

The number of DWV copies was determined by quantitative PCR using a StepOne-Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®, Life Technologies) and the SYBR Green detection method. For the experiment 1, pools of 15 bees from each treatment and replicate were crushed in a bag with 1.5mL of PBS, and then total RNA was extracted from 500 µL of homogenate in 900 mL of Qiazol. For Experiment 2, a pool of 3 bees per treatment and replicate was crushed directly in 900 mL of Qiazol with a 0.8 cm-diam. bead and a TissueLyser (Qiagen) (4 times 30 seconds at 30 Hz). The homogenate was then centrifuged for 2 min at 12,000 g and 4°C, and the supernatant was collected into a new tube to be processed for RNA extraction. Then, total RNA was extracted using Qiagen's RNeasy Universal Plus Mini Kit, following the manufacturer's instructions (QIAGEN, Hilden, Germany). RNA was quantified using a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific) then diluted to obtain a 500 ng/µl RNA concentration. Samples were stored at -80°C. Reverse transcription was performed with the High capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol.

For virus quantification, 3 microliters of 10-fold diluted cDNA were mixed with 7 µl of SYBR Green master mix (Applied Biosystems) containing 10 pmol of primers. DWV, but also ABPV, CBPV, BQCV and *Sacbrood bee virus* (SBV) loads were quantified using a

qPCR absolute quantification. A standard curve was obtained for each virus from serial dilutions of viral synthetic fragments of known concentration (MWG, Germany) and the log graph was used to calculate viral loads from Ct values in the samples. Amplification was performed with the following program: 10 min 95°C, then 40 cycles of 15 s at 95 °C, then 1 min at 60 °C. A melting curve was generated from 60 °C to 95 °C. Quantitation was replicated twice. Sequence primers and viral sequences used as reference are shown in Table S2.

Expression level of immune (vitellogenin, dorsal-1-a, apidaecin, pro-phenoloxdase (PPO)) and detoxication genes (glutathione-S-transferase 3, catalase and CYP6AS11) were assessed using the primer pairs reported in Table S2. Relative gene expression data were analysed using β -actin and RpL32 and the geometric mean of both as a reference (Reim et al., 2015). To verify that the amplification efficiencies of the target and reference genes were approximately equal, the amplification of five 10-fold dilutions of the total RNA sample (from 1.0 to 0.1 ng per reaction) in triplicate were analysed. The efficiency plot for Log input total RNA vs. Δ Ct had a slope lower than ± 0.1 . Amplifications for genes were performed using the StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Life Technologies) with the following thermal cycling profiles: one cycle at 48 °C for 15 min for reverse transcription, one cycle at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, and one cycle at 68 °C for 7 min, using the Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific). qRT-PCR mix for one sample was done as follow: 10 μ L of RT-PCR SYBR Green mix, 0.2 μ L of 10 μ M forward and reverse primer each, 0.16 μ L of Retro-transcriptase enzyme from the kit, 8.44 μ L of H₂O, and finally 1 μ L of RNA sample. All primer pairs were designed using PrimerExpress 3.0 software (Life Technologies) following the standard procedure. Negative (H₂O) and positive controls (previously identified positive samples) were included in each qRT-PCR run.

2.4. [Statistics](#)

Bee activity was analysed separately for bees exposed to DWV *per os* or via injection. *Per os* treatments included Control, 0.25 ng thiamethoxam, 1 ng thiamethoxam, DWV *per os*, and co-exposure to DWV *per os* and 1 ng thiamethoxam. Injected treatments included PBS injection, co-exposure to PBS and 0.25 ng thiamethoxam, DWV injection, co-exposure to

DWV and 0.25 ng thiamethoxam, and co-exposure to DWV and 1 ng thiamethoxam; in this group, PBS injection was used as control.

a) Bee survival and onset of foraging

The age at death was calculated using the last registered exit for each bee and a Kaplan-Meier estimation (Efron, 1988; Pepe and Fleming, 1989), and survival rates were calculated using the Cox proportional hazards model (Cox, 1972). Variations in the age at which bees performed their first foraging trip was analysed via a general linear mixed model fit by maximum likelihood (Laplace Approximation) using the Poisson probability distribution function. Treatment and month (April as basal level) were considered as fixed factors and the source colony as a random factor. The nature of the interaction was analysed using the χ^2 of compliance with 1 degree of freedom.

The proportions of bees lost after their first exit of the hive was analysed by comparing observed and expected proportions. χ^2 table was used first to compare all treatments with 9 degrees of freedom, then separately for each pairwise combination of treatments with 1 degree of freedom.

b) Virus and gene expression levels

For genes, analyses were carried out on the ΔCt (log 2). For viruses, they were carried on the log₁₀ of the obtained number of copies per bee. Analyses were carried out using either ANOVA followed by Tukey HSD when data followed a normal distribution (non-significant Shapiro-Wilk test) or a pairwise Wilcoxon test with Bonferroni correction when data did not follow a normal distribution (significant Shapiro-Wilk test). All statistical analyses were run with the software R (Version 1.0.143 – © 2009-2016 RStudio).

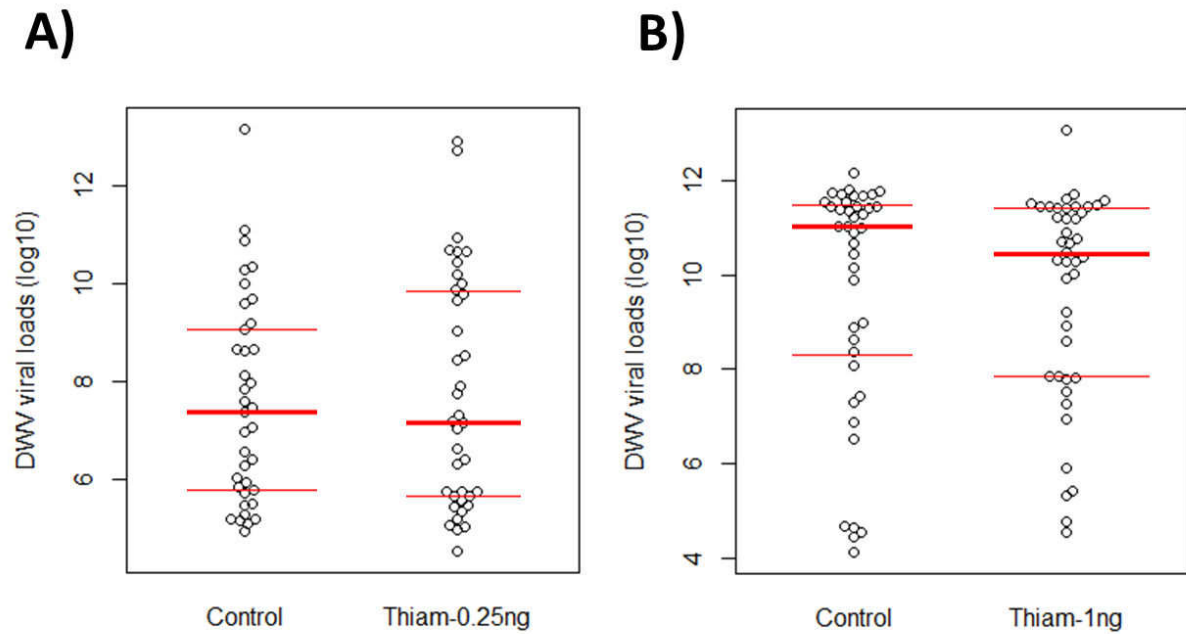


Figure 1: DWV infection level in control and thiametoxam-exposed bees (Experiment 1).
 A) Level of DWV loads in untreated (control) bees or bees exposed to 0.25 ng of thiametoxam- (Thiam-0.25 ng)(replicate 1, June 2016), B) Level of DWV loads in untreated (control) bees or bees exposed to 1 ng of thiametoxam- (Thiam-0.25 ng) (replicate 2 August 2016). Number of copies per bee are shown in log₁₀. In boxplots, red lines represent first quartile (25%), median (50%) and third quartile (75%).

3. Results

3.1. Thiamethoxam influence on viral loads

a) Thiamethoxam influence on natural DWV loads

We first checked whether thiamethoxam exposure impacts virus infection levels in bees originating from DWV naturally-infected colonies (Experiment 1). Control bees exhibited higher DWV loads in the first replicate (month) when compared to the second replicate (month) (Mann-Whitney's U test, $p < 0.01$, Fig. 1A and 1B). However, bees exposed to either 0.25 ng or 1 ng of thiamethoxam did not exhibit higher loads of DWV than control bees ($p = 0.945$ and $p = 0.474$, respectively; Fig. 1A and 1B)

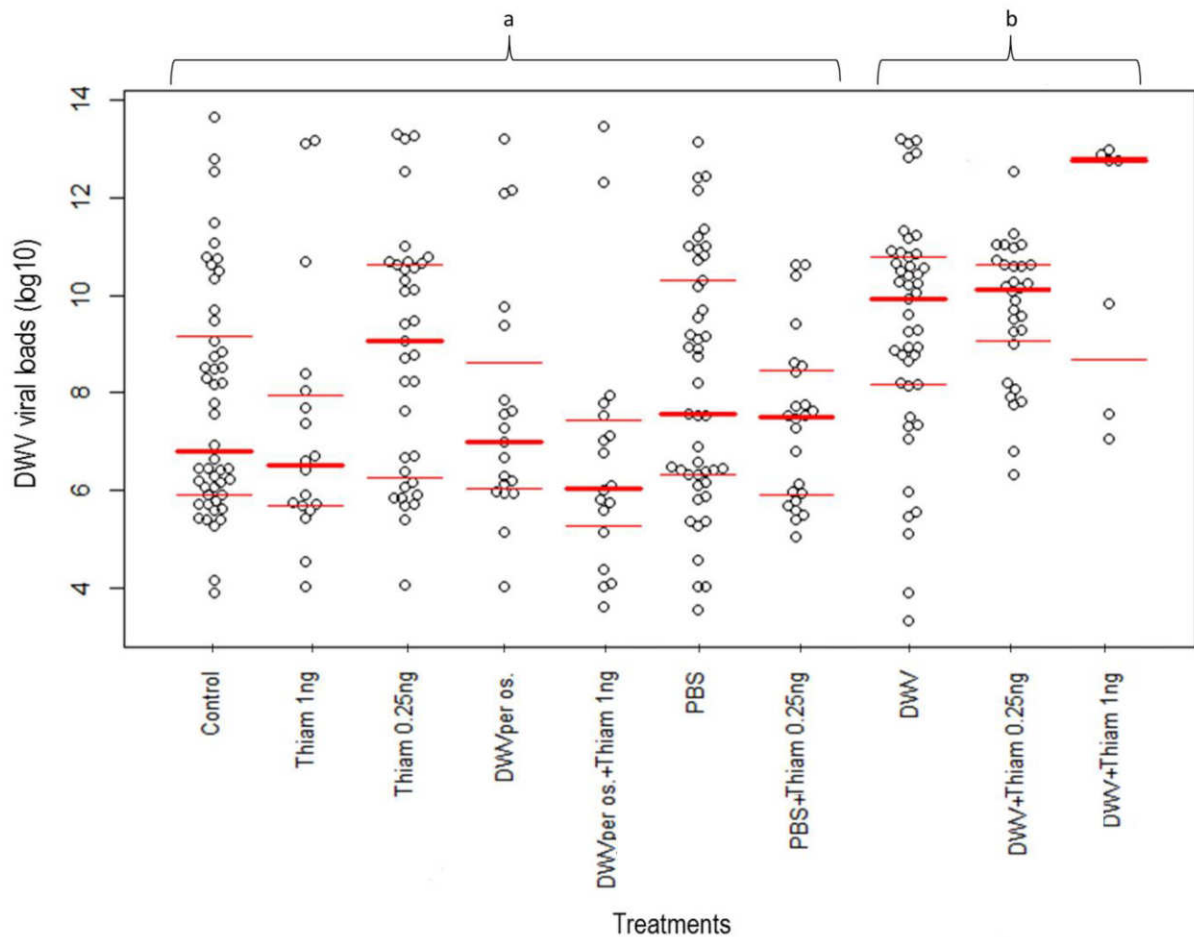


Figure 2: DWV infection level in bees exposed to thiametoxam and/or DWV (Experiment 2). The different treatments are: Control bees, bees injected with PBS (PBS), bees injected with PBS and exposed to 0.25 ng/bee of thiametoxam (PBS+0.25ng), bees exposed to 0.25 or 1 ng/bee of thiametoxam (Thiam 0.25ng and Thiam 1ng, respectively), bees infected with DWV (DWV *per os* and DWV injection, respectively), and bees co-exposed to DWV and thiametoxam (DWV *per os* and Thiam 1ng, DWV and Thiam 0.25ng, DWV and Thiam 1ng). Viral loads are shown in log₁₀. In boxplots, red lines represent first quartile (25%), median (50%) and third quartile (75%). Different letters show statistical differences between groups.

b) Thiamethoxam influence on DWV experimental infections and other natural infections

We also assessed whether exposure to thiamethoxam modified the virus infection levels in experimentally infected bees (Experiment 2). If *per os* infection with DWV did not induce a higher level of DWV as compared to control bees ($p=1$, Fig. 2), exposure by injection triggered a significant increase of DWV level in bees ($p=0.049$ for DWV alone and $p=0.003$ for the co-exposure to DWV and Thiam 0.25ng). Thiamethoxam exposure combined or not with DWV infection (*per os*), as well as PBS injection, did not affect DWV levels in bees ($p=1$ for all treatments compared to control). Bees co-exposed to DWV injection and 1 ng of thiamethoxam are showed on Fig. 2, but due to their low number of sample they were not significant (seven samples only could be retrieved, Table S1).

For all other tested viruses (ABPV, BQCV, CBPV, SBV) no significant changes between treatments was detected (Supplementary Fig. S1). However significant differences in their levels were observed between replicates (months), likely following a seasonal evolution (Aubert et al., 2008).

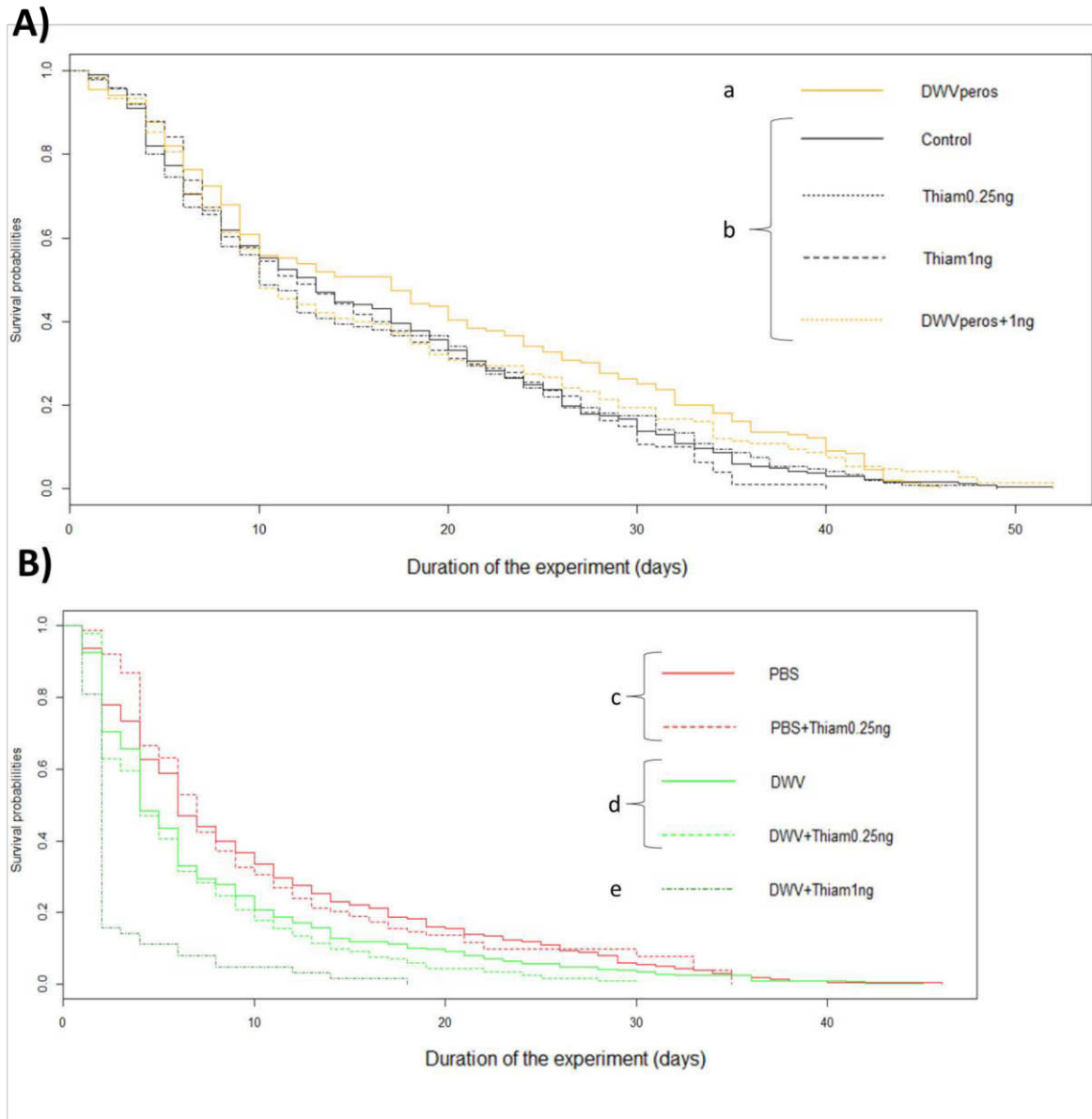


Figure 3: Survival curves of bees exposed to thiamethoxam and/or DWV.

A) Treatments *per os*: untreated bees (Control , n= 339 bees), Thiamethoxam 0.25 ng/bee (Thiam 0.25ng, n=302), Thiamethoxam 1 ng/bee (Thiam 1ng, n=150), DWV*per os* (n=153), DWV*per os* co-exposed with Thiamethoxam 1ng (DWV *per os* + Thiam 1ng, n=150); B) Treatments with injection: bees injected with PBS (PBS, used here as control, n=311 bees), PBS co-exposed with Thiamethoxam 0.25 ng (PBS+Thiam0.25ng, n=209), DWV (n=368), DWV co-exposed with thiamethoxam 0.25 ng/bee (DWV+Thiam0.25ng, n=253), DWV co-exposed with thiamethoxam 1 ng/bee (DWV+Thiam1ng, n=63), Different letters show statistical differences between groups..

3.2. Bee survival and onset of foraging

a) Survival

Regardless the dose, thiamethoxam did not affect bee survival as compared to control bees (0.25ng: $p=0.384$ and 1ng: $p=0.836$, Fig 3A), which was expected from sublethal doses. Furthermore, co-exposure to 1 ng thiamethoxam and DWV (*per os*) did not influence bee survival as compared to control and 1 ng thiamethoxam-exposed bees ($p=0.212$ and $p=0.276$, respectively). *per os* infection with DWV significantly increases survival probability as compared to control bees ($p=0.018$). The injection of DWV significantly decreases survival when compared to bees injected with PBS ($p<0.001$, Fig 3B). The lowest dose of thiamethoxam (0.25 ng) did not affect the survival of DWV- or PBS-injected bees when compared to bees only exposed to DWV or PBS ($p=0.122$ and $p=0.876$, respectively). However, the highest dose of thiamethoxam (1ng) decreased abruptly the survival of DWV-injected bees ($p<0.001$ for all treatment comparisons). Only ~10% of bees were alive 4 days after the co-exposure as compared to the 66% and 80% of bees alive in the DWV (injection) and 1 ng thiamethoxam groups.

A χ^2 of compliance test revealed that the interaction is indeed synergistic for this co-exposure ($p<0.05$, 1 ddl) but not for the co-exposure to DWV and 0.25 ng.

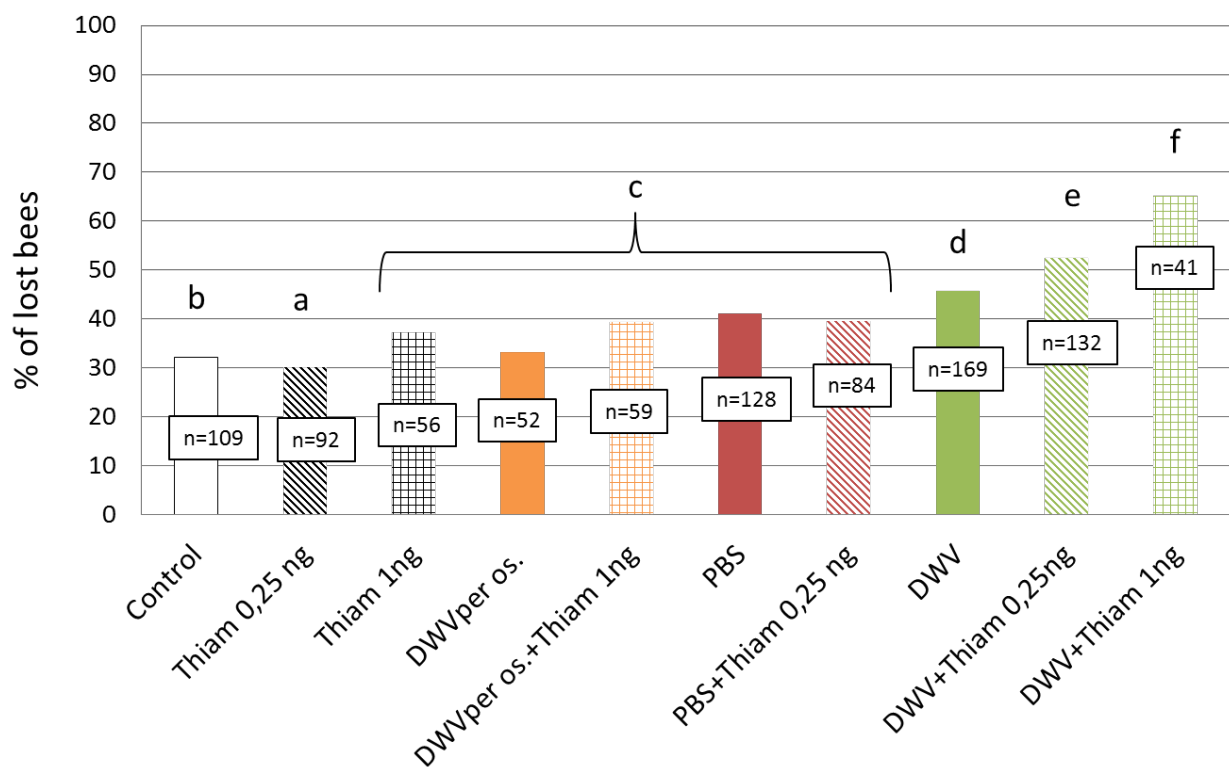


Figure 4: Proportion of bees that were lost at their first exit when exposed to thiametoxam and/or DWV. Number of lost bees are given for each treatment.

Treatments are: untreated control bees, bees fed with 0.25 ng of thiamethoxam, bees fed with 1 ng of thiamethoxam, bees fed with DWV (*per os*), bees co-exposed to thiamethoxam 1 ng and DWV *per os*, bees injected with PBS (PBS, used here as control), PBS co-exposed with 0.25 ng (PBS+Thiam0.25ng), DWV, DWV co-exposed with thiamethoxam 0.25ng/bee (DWV+Thiam0.25ng), DWV co-exposed with thiamethoxam 1 ng/bee (DWV+Thiam1ng). Letters show significantly different between groups ($p < 0.05$) from lowest to highest proportion of lost bees (a<<f).

b) Lost bees

The optical counter allowed us to record the number of bees that never returned to the colony after their first exit from the hive (lost bees). These lost bees were also used in the survival analysis (see above), since we assimilate last exit as a death. However, they were not used to study the precocious onset of foraging, since they left the hive once and never returned.

The lowest proportion of lost bees was found in the bees exposed to 0.25 ng thiamethoxam (30%); ($p < 0.001$ when compared to all others groups). Exposure to thiamethoxam 1 ng (37%), DWV *per os* (33%), DWV *per os* and 1 ng of thiamethoxam (39%), PBS (41%), and PBS and 0.25 ng of thiamethoxam (40%) induced a higher proportion of lost bees as compared to control bees (32%). The highest proportions of lost bees were observed in the following groups: DWV injection (46%) DWV injection and 0.25 ng of thiamethoxam (52%), and DWV injection and 1 ng of thiamethoxam (65%) (Fig. 2). Finally, co-exposure to DWV injection and 1 ng of thiamethoxam caused a significantly higher proportion of lost bees than DWV alone ($p < 0.001$) and co-exposure to DWV and 0.25 ng of thiamethoxam ($p < 0.001$).

Dependant variable	Covariate	Class	Coefficient	s.e.m.	P-value	Predicted mean age (days)
Age at first foraging flight (>10min) - oral exposures	Intercept (April)	Control	3.083	0.145	<0.001	21.83
	Treatments (April)	DWV <i>per os</i>	0.021	0.042	0.625	
		Thiamethoxam 0.25 ng/bee	0.086	0.035	0.015	23.78
		Thiamethoxam 1 ng/bee	-0.072	0.044	0.104	
		DWV <i>per os</i> + thiamethoxam 1 ng	-0.066	0.045	0.144	
	Replicates	May	-0.624	0.162	<0,001	
		July	-0.632	0.179	<0.001	
Age at first foraging flight (>10min) - injections	Intercept (April)	PBS	2.510	0.088	<0.001	12.30
	Treatments (April)	PBS+Thiam 0.25 ng	0.066	0.052	0.198	
		DWV	-0.120	0.045	0.007	10.91
		DWV+Thiam 0.25 ng	-0.181	0.059	0.001	10.26
		DWV+Thiam 1ng	-0.806	0.289	0.004	5.50
	Replicates	May	-0.333	0.098	<0.001	
		July	-0.544	0.108	<0.001	

Table 1: Coefficients, standard errors and associated *P*-values, and mean age of first foraging trip is calculated as $e^{(\text{estimate})}$, for the selected models investigating a treatment effect on bee first foraging trips.

Predicted mean ages of first flight are only shown when different from controls (Control or PBS injection).

c) Onset of foraging

Age at the first foraging flight (flights > 10 min) was determined for each treatment group. As for the survival analysis, groups of bees infected with DWV *per os* or via injection were analyzed separately (untreated and PBS-injected bees were assigned as controls in each analysis).

The age at onset of foraging differed between replicates (Fig.4). Indeed, for both treatment categories (*per os* and injected), bees started foraging overall significantly earlier in replicate 1 (May 2016+2017) and 2 (July 2016) than in replicate 3 (April 2017) (Table 1).

Regarding the treatment effects, among the non-injected bees (*per os*) only bees exposed to 0.25 ng of thiamethoxam exhibited a later onset of foraging. Among the injected bees, DWV, with or without co-exposure to the two doses of thiamethoxam, caused an earlier onset of foraging as compared to PBS-injected bees. While bees exposed to DWV and bees co-exposed to DWV and 0.25 ng of thiamethoxam did not start foraging at different ages, bees co-exposed to DWV and 1 ng of thiamethoxam started foraging 5 days earlier.

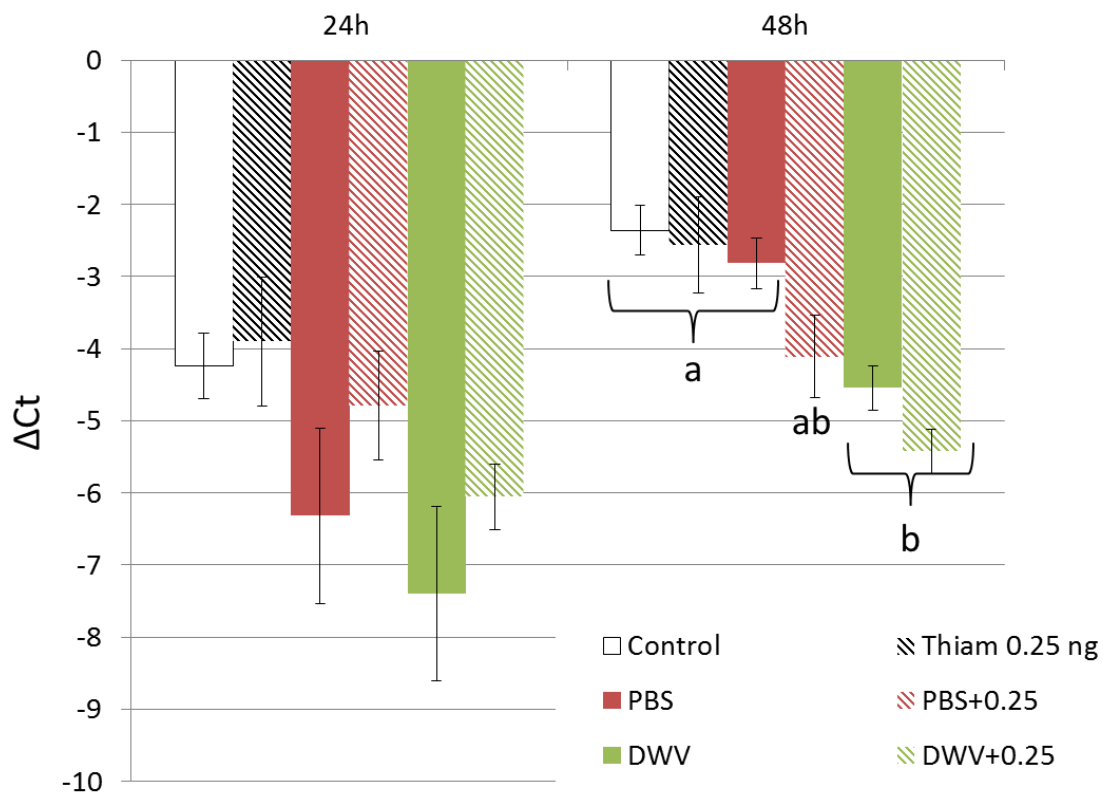


Figure 5: Vitellogenin expression level in bees exposed to DWV and/or thiamethoxam.

Mean \pm SD expression levels for untreated bees (control), bees exposed to 0.25 ng of thiamethoxam, PBS-injected bees, PBS-injected bees co-exposed to 0.25 ng of thiamethoxam, DWV-injected bees, and bees co-exposed to an injection of DWV and 0.25 ng of thiamethoxam are shown. Analyses were performed on bees sampled 24 or 48 h post exposure. Letters indicate significant difference ($p < 0.05$).

3.3. Expression level of immune and detoxication genes

Dorsal-1-a, apidaecin, pro-phenoloxydase, glutathione-S-transferase 3, catalase and CYP6AS11 genes were analysed only in bees sampled in replicate 1 and 2 (May and July 2016). Their expression level did not show any significant variation between experimental treatments ($p>0.05$) (data not shown).

Vitellogenin expression was not tested neither on DWV *per os* groups since no effect was observed on survival and onset of foraging, nor groups co-exposed to DWV and 1 ng of thiamethoxam since too few bees were collected alive (see “Lost bees”, Fig. 4).

There was no significant differences in vitellogenin expression between groups at 24h post exposure ($p>0.05$). At 48h post exposure, vitellogenin expression in control bees was not significantly different bees injected with PBS ($p=0.940$), bees exposed to thiamethoxam 0.25 ng ($p=0.999$), or bees co-exposed to 0.25 ng of thiamethoxam and PBS injection ($p=0.081$; Fig. 5). Bees injected with DWV or co-exposed to DWV and 0.25 ng of thiamethoxam exhibited a significantly lower vitellogenin expression level than control bees ($p<0.001$ for both), bees injected with PBS ($p=0.011$ and $p<0.001$, respectively), or bees exposed to 0.25 ng of thiamethoxam ($p=0.015$ and $p<0.001$, respectively). Vitellogenin expression between bees injected with DWV and bees co-exposed to DWV injection and 0.25 ng of thiamethoxam was not significantly different ($p=0.603$).

4. Discussion

The combination of stress factors has been suspected to decrease bee survival and therefore lead to colony failure. However, it remains unclear how they might affect bee in natural (colony) conditions. By co-exposing bees to DWV and the neonicotinoid thiamethoxam, we showed that the combination of both can significantly alter behavioural maturation, which causes a steep decrease in survival from premature foraging trips, with a higher failure to return to the colony.

Because other viruses than DWV could have naturally infected the tested bees, and could have introduced bias in our experiments, we tested the viral loads of four other frequently

occurring viruses. Given that the bees had been homogenized before the treatments, and taking into account the absence of significant differences between treatments in other virus levels, we assumed that any observed significant effects in bees were not linked to these background viral infections and could be attributed to our treatments.

To avoid a potential experimental bias due to the stress of injection injury for viral exposure, we carried out an experiment on naturally infected honeybee cohorts. We did not find any effect of thiamethoxam exposure on DWV level, as would be expected from an immunosuppression induced by neonicotinoids (ref). We hypothesise that DWV loads (10^7 to 10^{12} copies/bee) were too high to observe any potential DWV increase. While we selected colonies based on their low DWV-loads, the covert, background infections increased over the season. DWV load is known to increase from spring to autumn, which is intrinsically linked to seasonal population growth of the parasitic mite *Varroa* (Dainat et al., 2012a). Another way for us to avoid injection bias was to perform DWV-infection *per os*. Again, we did not find any significant effect on viral loads, even if we performed exposure with high numbers of DWV (inoculum with 10^8 copies of DWV per bee). This is in line with the findings of Ryabov et al., 2014 who showed that larvae reared in DWV symptomatic hives (thus exposed through alimentation), but not infested by *Varroa*, had DWV loads that stayed close to control (larvae raised in colonies with low DWV levels and no *Varroa*), while *Varroa* parasitized pupae developed very high loads of DWV. We conclude that feeding is not an efficient way to produce a significant experimental infection in honeybees.

Exposure to field-relevant doses of thiamethoxam did not either affect DWV loads in virus-injected bees. Similarly, it is possible that the virus background infection level was already too high to observe an increase in DWV level. However, injection of DWV did increase DWV loads in the tested bees, regardless of their co-exposure to thiamethoxam. Another explanation is that the most infected bees were excluded by nest mates as part of the social immunity (Baracchi et al., 2012; McDonnell et al., 2013), altruistically removed themselves (Rueppell et al., 2010) or simply died and could not be sampled. It should be noted that we previously observed that CBPV viral loads in dead honeybees were significantly different from viral loads in bees that were sacrificed on the same day (Coulon et al., personal communication).

Regarding survival, the DWV *per os* showed a better survival probability than control bees. This could be explained by the fact that, while bees did not replicate the virus, the ingested DWV could have triggered non-specific defence mechanisms (Alaux et al., 2010b; Evans and Spivak, 2010). However, DWV injection significantly decreased the survival rate of bees. These results are in line with previous studies showing that DWV has a deleterious effect on honeybee lifespan (Benaets et al., 2017; Dainat et al., 2012; Rueppell et al., 2017; Woyciechowski and Moron, 2009). Then, we found that bees co-exposed to DWV and 1 ng of thiamethoxam exhibited the lowest survival rate. Interestingly, exposure to 1 ng thiamethoxam alone did not affect bee survival, suggesting an interactive effect between the virus and the pesticide at the highest dose. Such interaction was not observed with the lowest thiamethoxam dose. The survival drop in bees co-exposed to DWV and 1 ng thiamethoxam was related to a higher number of bees that did not return to the colony after their first exit. Indeed, 65% of them never returned after their first exit. One simple explanation is that bees got lost on their return trips, as similarly observed in foragers after a similar dose of thiamethoxam (Henry et al., 2012). However, contrary to Henry et al., 2012, we did not find a significant loss in bees only exposed to thiamethoxam. The main difference is that bees in Henry et al., 2012 were released 1 km away from their colonies, and here bees were not exposed to this challenge. In addition, in this study the bees were exposed at a young age, as opposed to the foragers exposed in Henry et al. An age-dependant pesticide effect could explain the differences observed between both studies (Poquet et al., 2016). This effect was also observed to a lesser extent in bees co-exposed to DWV and 0.25 ng of thiamethoxam or only injected with DWV. At both thiamethoxam doses, the co-exposure effects were additive.

The lowest survival rate and higher rate of lost bees in the DWV and 1 ng thiamethoxam co-exposed group could be explained by their early onset of foraging. Indeed, such precocious foragers may not be optimally adapted to foraging tasks and are usually less resilient than normal foragers (Woyciechowski and Moron, 2009). They are heavier and exhibit lower flight performance than normal-aged foragers (Vance et al., 2009), likely due to different flight metabolic rates and muscle biochemistry (Schippers et al., 2006). Precocious foraging has been previously observed with DWV injections by (Benaets et al., 2017), but also with other stressors, such as *Varroa destructor* (Downey et al., 2000), *Nosema apis* (Wang and Moeller, 1970), or an early life CO₂ anaesthesia (Woyciechowski and Moron, 2009). However, we could not exclude either a self-removal or exclusion by nestmates from the colony (see above).

Considering that there is no effect of 1 ng of thiamethoxam alone, the expected outcome of an additive interaction between DWV injection and exposure to 1 ng of thiamethoxam would be equal to the effect of DWV injection alone. However, honeybees that were co-exposed to DWV and 1 ng of thiamethoxam started foraging at roughly half the age of bees exposed to DWV injection alone. This allows us to conclude that the effect co-exposure between DWV injection and 1 ng of thiamethoxam on this specific trait is of synergistic nature.

The observed effects of DWV injections and DWV co-exposures, highly accentuated by the highest dose of thiamethoxam especially, suggest that these treatments affect physiological traits in bees. Although no change in DWV load was observed when bees were co-exposed to the pesticide, we could not rule out a possible effect of the pesticide on DWV loads due to potential bias in bee sampling (sampling of alive bees, see above). However, it also underlines that the observed synergistic and additive effects must have another origin.

To further explore the influence of both DWV and thiamethoxam on bees, we analysed potential physiological changes, by focusing on immune and detoxication genes. None of the tested genes were affected by the treatments, except vitellogenin, suggesting a lack of effect on the immune and detoxication system. This is somehow in contradiction to a previous study, which shows that *dorsal-1a*, known to take part in the immune response, was down regulated by the thiamethoxam metabolite clothianidin (Di Prisco et al., 2013). However, our first sampling was performed 24 h after an acute exposure, which was probably too late to observe any reaction to the pesticide, as *dorsal-1a* has been shown to react to pesticide exposure then return quickly to normal level, during the very first hours after the honeybees have endured a clothianidine exposure (Di Prisco et al., 2013). The same *dorsal-1a* was also found to be down regulated in bees with high levels of DWV (Nazzi et al., 2012), but a later study reported that peaks in DWV were correlated to peaks in the expression of immune genes, including *dorsal-1a* (Steinmann et al., 2015).. This illustrates that immune responses varies greatly (Doublet et al., 2017) and the timing of sampling accounts a lot for this variation, especially for transcription factors of immune related genes in honeybees.

Vitellogenin is a protein, produced in the fat body, known to be involved in immunity through the regulation of haemocytes (Amdam et al., 2004b), but also involved in the regulation of division of labour. It is notably a key player in the regulation of behavioural maturation, with

a higher expression in nurses than in foragers (Amdam, 2011). The downregulation of vitellogenin upon DWV injection is consistent with previous studies performed on different stress factors (Boncristiani et al., 2012; Bordier et al., 2017). Antonio et al., 2008 and Nelson et al., 2007 showed that an RNAi mediated inhibition of the transcription of vitellogenin made bees forage (flight > 10 min) significantly earlier. We therefore propose that injection of DWV induced a precocious shift towards foraging activity through a down regulation of the transcription of vitellogenin. While we could not test on bees co-exposed to DWV and 1 ng of thiamethoxam, their very low survival and extremely precocious onset of foraging suggest that it could cause a yet steeper decline of vitellogenin.

In conclusion, our results on the pesticide influence on virus loads underlines the difficulty of extrapolating laboratory results to colony conditions. However, by performing behavioural experiments under the same natural conditions, we could identify negative effects of pesticide/virus co-exposure on bee survival and identify some underlying mechanisms (early onset of foraging and first foraging flight failure). Depending on the number of affected bees, this could result in a breakdown of division of labour and in a dramatic colony failure as indicated by Perry et al., 2016. Altogether, our data demonstrates the importance of field relevant conditions for a better understanding of the influence of stress factors in bees and likely colony failure.

Acknowledgments

This study was supported by INRA (Institut National de la Recherche Agronomique – National Institute for Agricultural Research) for the 2016 experiments and by the “Fondation Lune de Miel” for the 2017 experiments.

Supplementary Data

Setting				Treatments										
Experiment	Replicate	Month	Year	Control	Thiam0,25	Thiam1	DWV per os	DWV per os+Thiam 1	PBS	PBS+Thiam0,25	DWV	DWV+Thiam0,25	DWV+Thiam 1	
Experiment 2 (optical counters)	1	05/05/2016	2016	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	na	na	na	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	na	
	2	10/07/2016	2016	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	na	na	na	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	132 (66x2 colonies)	na	
	3	12/04/2017	2017	60	na	60	60	60	60	na	60	na	na	
	4	27/04/2017	2017	60	60	60	60	60	60	na	60	60	60	
	5	16/05/2017	2017	60	60	60	60	60	60	na	60	60	60	
Experiment 2 (painted bees)	1	05/05/2016	2016	100	100	na	na	na	100	100	100	100	na	
	2	10/07/2016	2016	100	100	na	na	na	100	100	100	100	na	
	3	12/04/2017	2017	80	na	80	80	80	80	na	80	na	na	
	4	27/04/2017	2017	80	80	80	80	80	83	na	79	80	83	
	5	16/05/2017	2017	80	80	80	80	80	80	na	80	80	80	

Table S1: Sampling size for survival and onset of foraging experiment (bee counter).

Name	Sequence (5'-3')	bp	Reference
CYP6AS14			
F	TGACATTGAGTTGACGGACGAT	64	this work
R	GAAACCTGCCGCGAAGAA		
GSTS3			
F	AAACCGATAGCGCAGAGTAACG	87	this work
R	CATCATTGCCTCCCATTCTGT		
Catalase			
F	TTTGGTGGGCCTAGAGAATGTC	92	this work
R	TCCTCCTTTGGGTCTACATCATAAC		
Apidaecin			
F	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	81	(Di Prisco et al., 2016)
R	GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT		
Dorsal-1A			
F	TCGGATGGTGCTACGAGCGA	153	(Di Prisco et al., 2016)
R	AGCATGCTTCTCAGCTTCTGCCT		
Vitellogenin			
F	AACGCCGTGAAGGTGAACAG	109	this work
R	TATCGTAGAGAACCTCGCATTTC		
PPOAct			
F	CGTTGAAAAGTCGAAGCAGATTAA	112	this work
R	AGGACGCCACCGCAGTATT		
β-actin			
F	GATTTGTATGCCAACACTGTCCTT	69	(Di Prisco et al., 2016)
R	TTGCATTCTATCTGCGATTCCA		
RpL32			
F	CGTCATATGTTGCCAACTGGTTT	107	this work
R	CCATGAGCAATTCAGCACAA		
DWV			
DWV-F8688	GGTAAGCGATGGTTGTTTG	143	(Locke et al., 2012)
DWV-B8794	CCGTGAATATAGTGTGAGG		
ABPV			
ABPV-F6548	TCATACCTGCCGATCAAG	197	(Locke et al., 2012)
KIABPV-B6707	CTGAATAATACTGTGCGTATC		
SBV			
SBV-qF3164	TTGGAACCTACGCATTCTCTG	226	(Locke et al., 2012)
SBV-qB3461	CTCTAACCTCGCATCAAC		
BQCV			
BQCV-qF7893	AGTGGCGGAGATGTATGC	294	(Locke et al., 2012)
BQCV-qB8150	GGAGGTGAAGTGGCTATATC		
CBPV			
CBPV1-qF1818	CAACCTGCCTCAACACAG	296	(Locke et al., 2012)
CBPV1-qB2077	AATCTGGCAAGGTTGACTGG		

Table S2: Primers used for the quantification of selected honeybee genes and viruses.

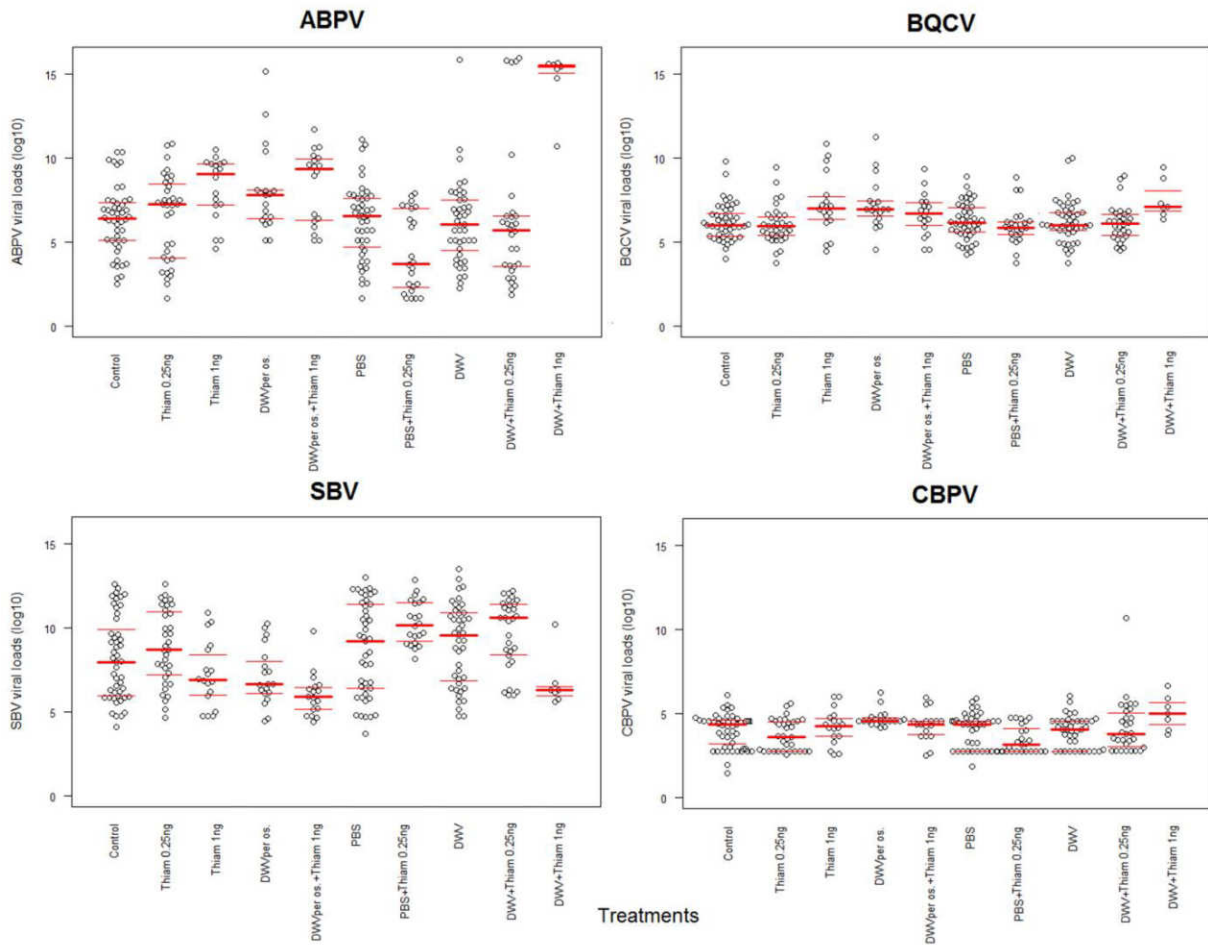


Figure S1: Viral loads distributions for the four additionally tested viruses according to treatments.

Viral loads are shown in \log_{10} . The different treatments are: Control bees, bees injected with PBS (PBS), bees injected with PBS and exposed to 0.25 ng/bee of thiamethoxam (PBS+0.25ng), bees exposed to 0.25 or 1 ng/bee of thiamethoxam (Thiam 0.25ng and Thiam 1ng, respectively), bees infected with DWV (DWV *per os* and DWV injection, respectively), and bees co-exposed to DWV and thiamethoxam (DWV *per os* and Thiam 1ng, DWV and Thiam 0.25ng, DWV and Thiam 1ng). In boxplots, red lines represent first quartile (25%), median (50%) and third quartile (75%). Different letters show statistical differences between groups. Swarms show the distribution of populations, representing each sample.

2. Développement d'un clone du DWV par recombinaison homologue en levure

Les virus de l'abeille, bien que répandus et de plus en plus étudiés en cagette et *in situ*, ne sont cependant que très peu voire pas du tout étudiés *in vitro*. Approfondir les connaissances encore parcellaires sur les mécanismes d'infection pourrait permettre d'affiner nos études de co-expositions. Les clones moléculaires de virus peuvent être utilisés comme des outils de génétique inverse pour mieux étudier ces mécanismes, leurs génomes et les protéines qu'ils produisent. Le génome du CBPV a été cloné récemment par Ibrahim Youssef lors de sa thèse au laboratoire de l'Anses Sophia Antipolis, ce qui lui a permis d'étudier plus en détails notamment les ORF présents sur ce génome (Youssef, 2016).

De plus, la plupart des infections virales chez l'abeille sont étudiées en utilisant des *inocula* extraits à partir d'échantillons d'abeilles infectées naturellement. Cependant, compte tenu de la relative proximité génétique et structurale des principaux virus qui infectent l'abeille domestique (DWV, BQCV, le complexe AKI, et SBV par exemple sont tous des virus de l'ordre *Picornavirales*) il est extrêmement difficile même en passant par une étape de purification d'être sûr de n'inoculer que le virus étudié. Dès lors, le développement d'un outil permettant une production constante de souches spécifiques à chaque variant, multipliées *in vitro*, peut permettre d'obtenir des inocula purs du virus d'intérêt, de diminuer les biais dus à des infections multiples, et d'augmenter la répétabilité des expériences.

Dans le cas du DWV, un clone infectieux du DWV-A a déjà été développé par Lamp et al., 2016. Nous avons ici utilisé une autre technique avec une ligation par passage en levures d'après Desbiez et al., 2012, et produit des clones infectieux d'une souche locale de DWV-A, ainsi que d'un recombinant DWV-A/B (Dalmon et al., 2017). De plus, nous avons tenté de fabriquer des clones permettant d'être directement inoculé aux nymphes sans passer par une étape de transcription *in vitro*, ce qui n'est pas le cas des clones cités. Les résultats obtenus lors de ce développement d'un clone et des tests d'infectiosité qui ont suivi sont présentés sous forme d'article en prévision d'une valorisation scientifique. Cependant cet article devra être complété par des expériences ultérieures avant soumission à un journal pour publication. En effet, pour cause de contraintes réglementaires, un délai a été imposé avant de pouvoir effectuer les expériences et tester l'infectivité des clones, ce qui n'a pas permis d'aller

jusqu'au bout de nos essais pour l'instant. Le développement et les premiers tests effectués sont cependant importants, car il n'existe à ce jour qu'un seul clone du DWV décrit dans la littérature(Lamp et al., 2016)(Lamp et al., 2016).

Article 4:

Construction of a cDNA clone of *Deformed wing virus-A* and an A/B recombinant (genus *Iflavirus*, family Iflaviridae)

M. Coulon ^{a, b}, C. Desbiez ^c, B. Moury ^c, C. Alaux ^a, Y. Le Conte ^a, M. Ribière-Chabert ^b, R. Thiéry ^b, E. Dubois ^b, A. Dalmon ^a

^a INRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, F84914 Avignon, France

^b ANSES Sophia Antipolis, Unit of Honeybee Pathology, 105, route des Chappes, F06902 Sophia Antipolis, France

^c INRA PACA, UR 407 Pathologie végétale, F-84143 Montfavet, France

Corresponding author: anne.dalmon@inra.fr

1. Introduction

Over the last decades, a great decline of pollinators has been recorded (S. G. Potts et al., 2010a; van der Sluijs et al., 2013). These losses are now attributed to diverse factors, of which the most studied are the loss of habitats, global warming, decreasing availability in food resources, pesticide use, and pathogens (Goulson et al., 2015). Domestic honeybee colony losses have been recorded, and can be considered as a bio-indicator of the state of other pollinators species in the world (Goulson and Nicholls, 2016; Laurent et al., 2015), for which losses are harder to evaluate. Among pathogens that are harmful to honeybees, *Deformed wing virus* (DWV) is one of the most prevalent, present in 97% of tested apiaries in France (Tentcheva et al., 2004), 91% in Austria (Berényi et al., 2006) and 72% in Hungary (Forgách

et al., 2008). DWV has been shown to be easily transmitted to wild pollinators such as bumblebees through pollen (Singh et al., 2010) or even wasps (Evison et al., 2012). Spillover of DWV infection from honeybee managed colonies to wild populations have already been observed and are considered an additional risk of stress to these wild pollinators (Fürst et al., 2014; Kojima et al., 2011; Manley et al., 2015; Tehel et al., 2016).

This underlines the importance of studying DWV, not only as a harmful pathogen of the domestic honeybee, but also of a broader range of pollinators, and of understanding its infection mechanisms and cellular processes in diverse species. DWV is a single-strand positive-sense RNA virus, of the genus *Iflavirus* and the family *Iflaviridae* of the *Picornavirales* order. The *Picornavirales* gathers many of the honeybee viruses, such as *Black queen cell virus* (BQCV), which is also an *Iflavirus*, and also *Acute bee paralysis virus* (ABPV), *Kashmir bee virus* (KBV) and *Israeli acute paralysis virus* (IAPV), which are from the family *Dicistroviridae*. DWV gathers a number of viral groups (de Miranda and Genersch, 2010), of which the most widespread are the regular DWV reference DWV-A, and DWV-B, formerly called VDV-1 (for *Varroa destructor virus 1*) (Mordecai et al., 2016, 2015). Both groups include large numbers of variants and recombinants between them have been documented (Dalmon et al., 2017; Moore et al., 2011; Ryabov et al., 2014; Zioni et al., 2011). DWV virions do not possess an envelope and the capsid is icosahedric. DWV genome is about 10 kb long, and possesses a long Untranslated Region (UTR) at the 5' extremity, another one shorter but very conserved at 3', as well as a poly (A) tail. In between, a single large open reading frame codes for only one polyprotein that is later cleaved into 3 major structural proteins at the N-terminal extremity (VP1 44kDa ; VP2 32 kDa ; VP3 28 kDa), and 3 non-structural proteins that are known to take part in viral replication of picorna-like viruses are located in the C-terminal extremity (helicase, chymotrypsin-like 3C protease, RdRp (RNA dependent RNA polymerase) (de Miranda and Genersch, 2010; Lanzi et al., 2006; Škubník et al., 2017).

DWV is strongly associated with overwintering colony losses in honeybees (Dainat et al., 2012a; de Miranda and Genersch, 2010; Desai and Currie, 2016; Francis et al., 2013; VanEngelsdorp et al., 2013). The most visible symptom in the hive is the presence of emerging bees with deformed wings (Aubert et al., 2008; de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011), which bumblebees can also develop (Genersch et al., 2006; Graystock et al., 2016). DWV at sublethal doses in honeybees is known to impair associative learning and

memory formation (Iqbal and Mueller, 2007), to cause precocious foraging trips (Benaets et al., 2017) and to reduce the workers lifespan drastically (Rueppell et al., 2017). In honeybees, overt infections often occur when the virus is injected directly into the pupae hemolymph by the *Varroa destructor* mite (de Miranda and Genersch, 2010; Möckel et al., 2011). The mite acts as a vector in horizontal transmission, selects virulence (Martin et al., 2012) and transmits different virus species. As a consequence, honeybees (Chen et al., 2004) often carry multiple viruses in co-infection. However, most honeybee viruses being part of the same order, they are also close in size (~30nm) and structure (icosahedric capsids) which does not allow for an easy discrimination between different viruses when carrying out viral purification from field samples. This can cause many problems when attempting to determine the etiology of viral diseases or studying determinants of virulence. As a result, few studies have uncovered the molecular infection mechanisms of this virus or characterised functions associated to its genome regions or to particular mutation or recombination events. Creating DWV clones, including some variants or recombinants, would allow these studies to take place through reverse genetics. It would also allow experiments on honeybees to be carried out with standardized viral strains, and avoid the difficult purification (Lamp et al., 2016).

Contrary to classic (forward) genetics, which observes phenotypic variations and then aims to identify the causative genetic polymorphism, reverse genetics starts by inducing a genetic modification and measures its effects on the phenotype. cDNA clones are versatile tools to perform such reverse genetics studies. The first infectious cDNA clone from a virus to have been developed was another *Picornavirus*, *Poliovirus* (Racaniello and Baltimore, 1981). Only two infectious cDNA clones of honeybee viruses have been obtained, one for DWV (Lamp et al., 2016) and one for BQCV (Benjeddou et al., 2002)).

To develop a reverse genetic tool for DWV, we have set up two DWV clones: one of the reference, DWV-A, strain and one of a recombinant between DWV-A and DWV-B strains. This study is, to our knowledge, the first attempt at producing a clone of a recombinant of DWV-A and B, and the first use of a HandGun to inoculate a plasmid to honeybee pupae in the attempt of reducing injection stresses (notably necrosis).

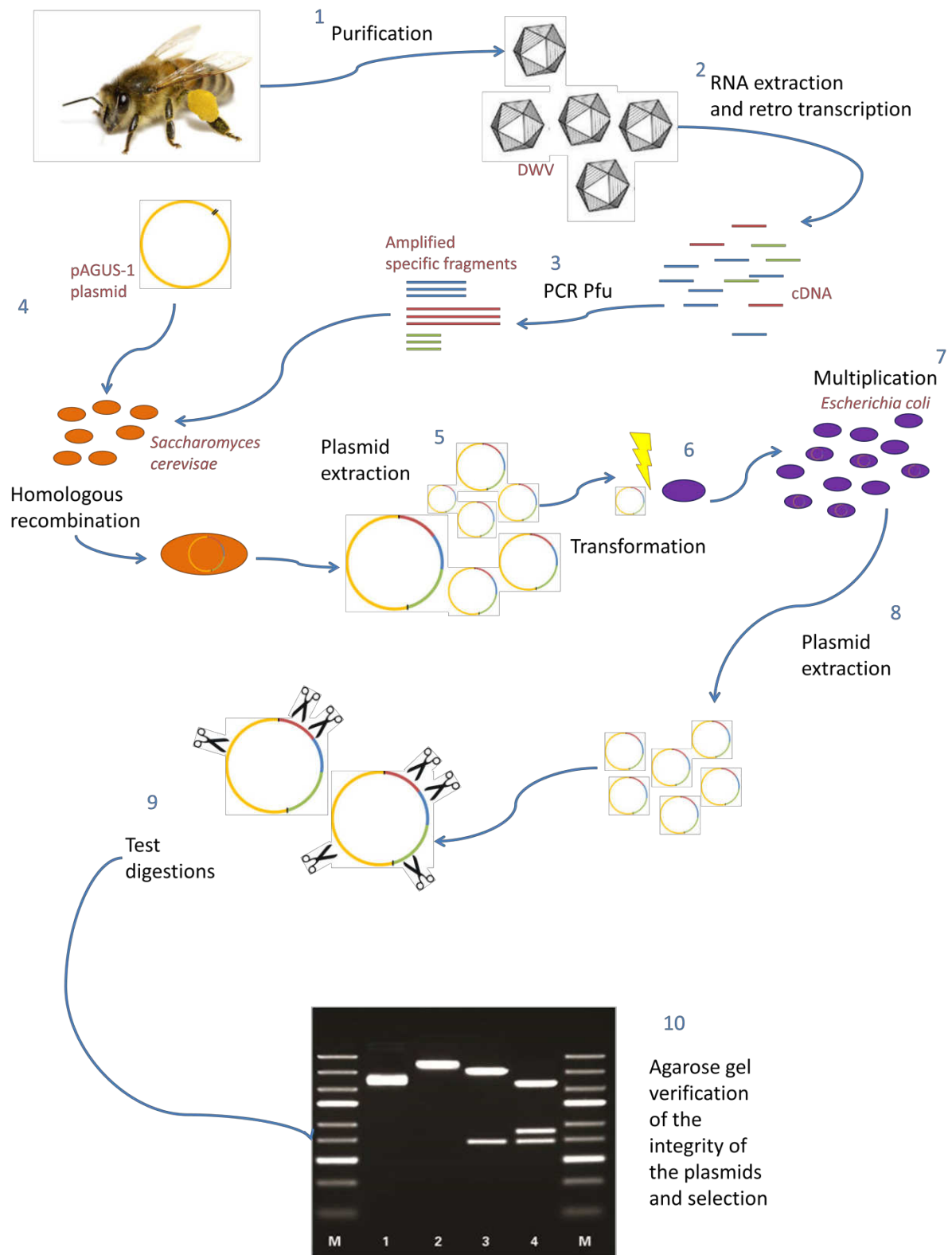


Figure 1: Summary diagram of the steps followed to obtain the two different DWV plasmid clones.

2. Materials and Methods

2.1. [DWV isolates](#)

Two isolates were chosen to be purified and cloned in plasmids, one native DWV-A isolate hereby named DWV-Fr1 from one colony with deformed wing symptoms located in the experimental apiary of INRA Avignon (South-Eastern France) and one DWV-A/DWV-B recombinant isolate named RecVT-Fr1 from a Varroa-tolerant colony (Le Conte et al., 2007), from the same location. Both isolates sequences were published under the numbers KX373899 for isolate DWV-Fr1 and KX373900 for isolate RecVT-Fr1 (Dalmon et al., 2017).

2.2. [Viral purification](#)

DWV was purified from the two different isolates after propagation honeybee pupae. Before propagation DWV-Fr1 was extracted from stored honeybees and RecVT-Fr1 from stored pupae. First, propagation was carried out by serial inoculations, injecting the isolates extracted from honeybees into red-eye pupae, which were kept to multiply the virus for 24 to 48h at 34°C and with saturated humidity. Then purification was carried out using a 30% sucrose cushion followed by a cesium chloride (CsCl) gradient, following the protocol described in (Desbiez and Lecoq, 1997).

a) [Sucrose cushion](#)

First step in sucrose cushion was carried out following protocol from (Ryabov et al., 2009). Briefly, for each isolate, 20 pupae were crushed in 5mL of 0.01 M, pH 7 phosphate buffer (previously prepared by mixing a solution of 0.01 M K_2HPO_4 (0.23 g + 100 mL distilled H_2O) and a solution of 0.01 M KH_2PO_4 (0.137 g +100 mL H_2O)). The sucrose cushion was prepared using a 30% sucrose solution (weight/volume) in distilled water (ΔH_2O). The obtained solution was submitted to low speed centrifugation for 15 min at 15 000 g and around 4mL of supernatant was transferred in specific ultracentrifuge bottles. 2 mL of 30% sucrose solution was deposited at the bottom of the bottle using a syringe, and the bottles were

Isolate	Name	Sequence	F/R	Amplicon length (bp)	Reference
DWV-Fr1	ITRØ	ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGTTTAAAA TTCGCTATGGGAGG	F	2922	This study (Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP5r_2922	GCATAAACATACTAGATACG	R		
	BTsd	CTGTAGGTTGTGCTCCTGATGAAGA	F	2415	(Gisder et al., 2009)
	DWV-Hel5r_5148	TACCTGATTACTACCTCTAC	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3f_4041	CATTG(T/C)ATGTTTACCTTCCC	F	2652	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-6693r	GTTACACGACGCTTACTACAC	R		(Berényi et al., 2007)
	DWV-Hel3f_6558	AGATGAAGAACTTATGGGCG	F	1296	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-Rd5r_7954	CCAATAGCTGAgTATGGtCGCC	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-Hel3f_7326	GCTGATCATTATGTGAATAGGC	F	2815	(Dalmon et al., 2017)
	END	GCGAATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTATTATGGTTAAAAC	R		This study
RecVT-Fr1	ITRØ	ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGTTTAAAA TTCGCTATGGGAGG	F	2922	This study (Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP5r_2922	GCATAAACATACTAGATACG	R		
	DWV-Lp5r_1263	TA(T/C)GAGTTAGAGTGTGT(C/T)AC	F	2881	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3r_4144	TACCCTGACGCTATCAATGG	R		(Dalmon et al., 2017)
	DWV-CP3f_4021	TACGGATAAGGATATTGATC	F	2672	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-6693r	GTTACACGACGCTTACTACAC	R		(Berényi et al., 2007)
	DWV-5992f	TCCTATTGCTGAATGTAGTC	F	2916	(Berényi et al., 2007)
	DWV-Rd5r_8908	CTAAGTAATACTGTGCGAAA(T/C)GG	R		(Dalmon et al., 2017)
	Rd5f_7826	GCTTGTGACTATGCCTAATCG	F	2315	This study
	END	GCGAATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT GCTATTATGGTTAAAAC	R		This study
Sequencing	DWV-ITR5f_43	TTTAGATAGTAGCCATGAAC	F	1795	(Dalmon et al., 2017)
	DWV-1795r	TACGTTCTTGCTCCAGCGCC	R		(Dalmon et al., 2017)

Table 1: Primers used in this study for each isolate, and references.

equilibrated using phosphate buffer. Samples were centrifuged during 6 h at 4°C, 100 000 g in a Beckman LE-80 ultracentrifuge using a 70.1Ti rotor. The supernatant was eliminated and 4 mL of phosphate buffer was added before agitating on ice overnight to resuspend the pellet.

b) CsCl gradient

5.48 g of CsCl were added to 4 mL of each resuspended pellet (1.37 g/mL). Samples were centrifuged for more than 16h, at 132 000 g at 4°C using the same rotor as above. The thick white strip that could be seen in each sample was collected using a bevelled syringe.

CsCl was eliminated using a protocol adapted from (Ryabov et al., 2009). Samples were diluted to 1/60th in 0.01 M phosphate buffer (0.5 mL of each in 30 mL) and centrifuged for 3 h at 4°C, 30 000 g.

The supernatant was eliminated and pellets were resuspended in 500 µL of phosphate buffer, on ice with gentle agitation. Fifty µL of each sample were used to extract RNA for quantification and amplification.

2.3. RNA extraction

RNA from the two samples was extracted using the Tri-reagent kit. Briefly, 500 µL of Tri-reagent were added to 50 µL of purified virus. The mixture was incubated for 5 min at room temperature, then 100 µL of chloroform were added, and the mixture was incubated again, after vigorous shaking, at room temperature for 5 to 10 min. Samples were centrifuged for 15 min at 12 000 g at 4°C. The upper aqueous phase was collected and the RNAs were precipitated using an equal volume of isopropanol. After centrifugation for 8 min and 12 000 g at 4°C and washing with 70° ethanol, the pellets were resuspended in 50 µL of ΔH₂O. RNA samples were stored at -20°C until use.

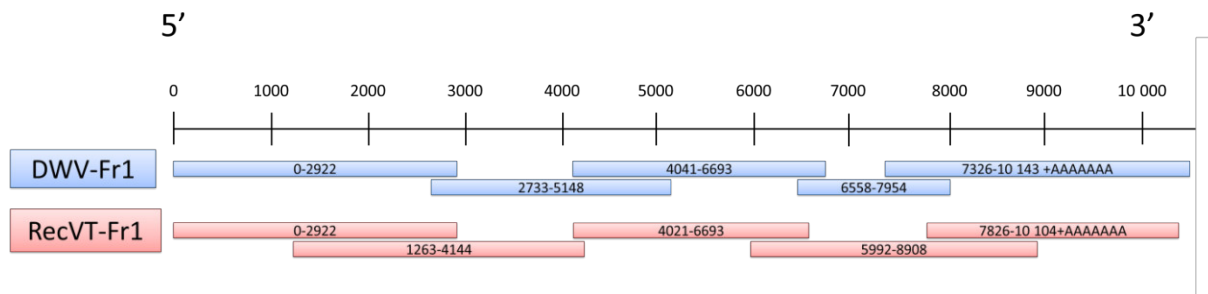


Figure 2: Amplified overlapping genome fragments used to construct DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 cDNA clones.

2.4. [Amplification and purification of genome fragments](#)

Reverse transcription and amplification of cDNAs for DWV-Fr1 and n°RecVT-Fr1 were as described by Desbiez et al., 2012. Amplifications were performed with Pfu DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The complete genome of

DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 were amplified in 5 overlapping fragments using 5 primer pairs (Table 1). The fragments are different between DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 (Fig. 2). The PCR products were purified from 1% agarose gel and used for subsequent cloning.

2.5. [Regulations](#)

Cloning experiments and the following infectivity tests in France fall under the regulation of genetically modified organisms, defined by the High Council for Biotechnology (HCB) (Haut conseil des biotechnologies, 2013) since 2008. Our experiments are classified *C1* for the cloning of DWV genome in bacterial plasmids, and *C2* for the infectivity tests on honeybee nymphs. *C1* asks for a declaration of GMO production and use while *C2* asks for a confined environment in certified laboratories. We carried out all the cloning and infectivity experiment in a certified laboratory, adding a second layer of confinement (confined room) for the *C2* classified part. This is also the reason why we have inoculated pupae instead of adult honeybees. Not only do pupae multiply viruses more easily through their lack of fully formed immune defences (de Miranda et al., 2013; Evans et al., 2006), but they also have the advantage of being totally immobile, diminishing the risk of spillover. A specific authorization from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), was required in April 2015. Confirmation of authorization, reviewed by the HCB, for virus cloning into plasmids (*C1*) and subsequent infectivity tests on live honeybee pupae (*C2*) was received on 17/10/2016.

2.6. [Cloning](#)

The complete genomes of DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 were cloned using homologous recombination in yeast (Fig. 1, 2 and 3) as described by Desbiez et al., 2012. Homologous

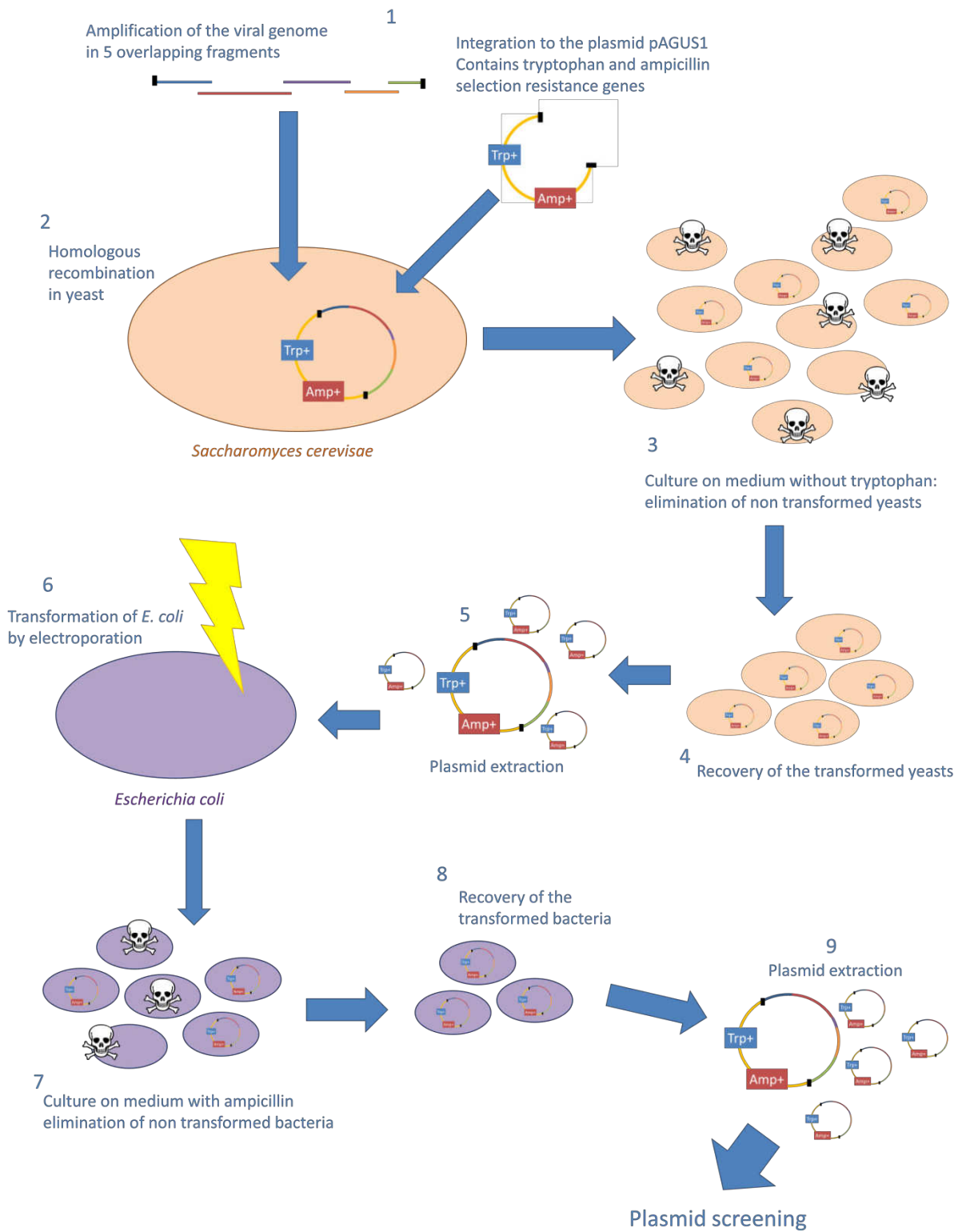


Figure 3: Detailed diagram of the cloning steps.

recombination naturally occurs in *Saccharomyces cerevisiae* when overlapping linear DNA fragments are present in the organism. This mechanism can be used for biotechnology purposes by co-transforming *Saccharomyces cerevisiae* with different linear DNA fragments and works also for large fragments (Raymond et al., 2002). This method is much simpler than *in vitro* ligation of DNA fragments sharing compatible ends, which requires appropriate restriction sites and usually several successive cloning steps to incorporate all genome fragments into a full-length clone.

a) Plasmid vector

To prepare the plasmid vector, an infectious clone of PRSV (*Papaya Ringspot Virus*) in pAGUS (Desbiez et al., 2012) was digested with EcoRI in order to remove most of the viral insert. pAGUS contains the 35S plant promoter which has been found to be very efficient in a number of hosts (Desbiez et al., 2012), and the 2 μ m yeast replication origin. It also contains a tryptophan synthesis gene and an ampicillin resistance gene for selection of recombinants (Fig. 3). The 6kb fragment containing the pAGUS vector and the extremities of the PRSV construct was excised from agarose gel, ligated using T4 DNA ligase and the ligation product was transformed and multiplied in *E. coli*, yielding the PRSV(delta)Eco clone. The empty plasmid clone was linearized with EcoRI before use for yeast transformation.

b) Yeasts transformation

Competent cells of the diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain YPH501, auxotrophic for tryptophan (Sikorski and Hieter, 1989) were obtained as described in Desbiez et al., 2012 and stored at -80°C before use.

Fifteen μ L of insert DNAs and plasmid were added to 40 μ L of the thawed yeasts with an insert/vector ratio of 3:1, with 800 μ L of PEG 4000 (polyethylene glycol 40%, bicine 200mM, pH 8.35) and 7 μ l of sonicated heat-denaturated salmon sperm DNA (10 mg/ml) as a carrier. After 1h30 of incubation at 30°C and under gentle agitation, the yeasts were pelleted by 5 000 g centrifugation for 5 min. The supernatant was discarded, 1 mL of NB buffer (NaCL 0.15 M, bicine 10 mM, pH 8,35) was added and the samples were centrifuged again for 5 min at 5 000 g. 900 μ L of the supernatant were discarded and the

yeasts were resuspended in the remaining 100 μ L and plated on CAU solid selective medium (0.1% casamino acid containing no tryptophan, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.0025% adenine sulfate, 0.0025% uracil, 2% d-glucose) (Desbiez et al., 2012; Sikorski and Hieter, 1989) at 30°C for at least 48h. Our strain of *Saccharomyces cerevisiae* being unable to synthesize tryptophan, only the yeasts which genome is complemented by a recombinant plasmid will be able to grow.

c) Plasmidic DNA extraction from yeasts

Four and 8 yeast colonies (depending on the number of transformed colonies available) were collected respectively from samples DWV-Fr1 and RecVT-Fr1, inoculated in 2 ml of liquid CAU medium and grown overnight at 30°C. Plasmids were extracted following (Desbiez et al., 2012; Hoffman and Winston, 1987). Briefly, the cells were collected by a 5 000 g, 5 min centrifugation and resuspended in 200 μ L of a buffer containing 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA. Two hundred microliters of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (50:49:1 in volume) and 0.3 g of 0.45 mm acid-washed glass beads (Sigma) were added, and the suspension was vortexed for 5 min. Samples were again centrifuged for 5 min at 14 000 g, supernatant recovered, and 200 μ L of a chloroform:isoamyl alcohol (24:1 in volume) added. Plasmidic DNA was recovered, after a new centrifugation for 5 min at 14 000 g, by ethanol precipitation and resuspended in 10 μ l of de-ionized water.

d) *E. coli* transformation and plasmidic DNA extraction

Electrocompetent *E. coli* were transformed following standard protocols. Only 3 of the previously obtained constructs were used for each isolate. Electrocompetent bacteria (40 μ l) were added to a tube with 40 μ L of cold 10% glycerol. Electroporation was carried out on ice using a Bio-Rad electroporator (5 mS). The cells were plated on LB Agar medium with 100 μ g/ml ampicillin.

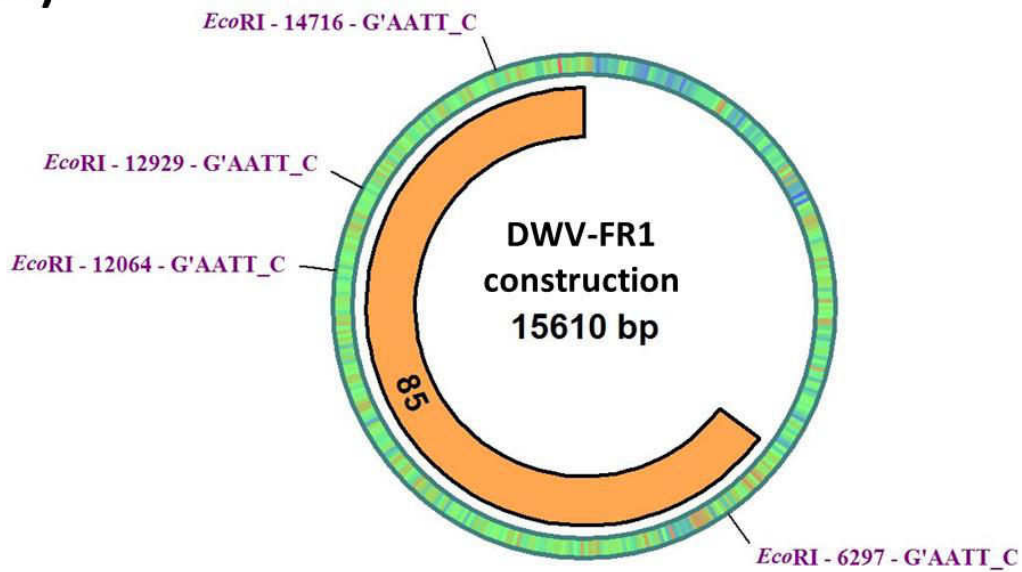
For each isolate, 6 colonies were selected to maximise the chances of getting complete clones, then cultivated overnight in liquid LB medium with 100 μ g/ml ampicillin (as plasmid contains

a resistance gene to ampicillin as a selection tool). Bacterial plasmid DNA was extracted by alkaline lysis (Miniprep).

e) Plasmid control by restriction analysis

Screening was performed by restriction enzyme analysis. Enzymes were chosen using the software p-DRAW32 (AcaClone software) (Fig. 4). Expected products are 7191 pb, 5767 pb, 1787 pb and 865 pb for DWV-Fr1 and 1309 pb, 1413 pb, 1479 pb, 2033 pb, 3259 pb and 6123 pb for RecVT-Fr1.

A)



B)

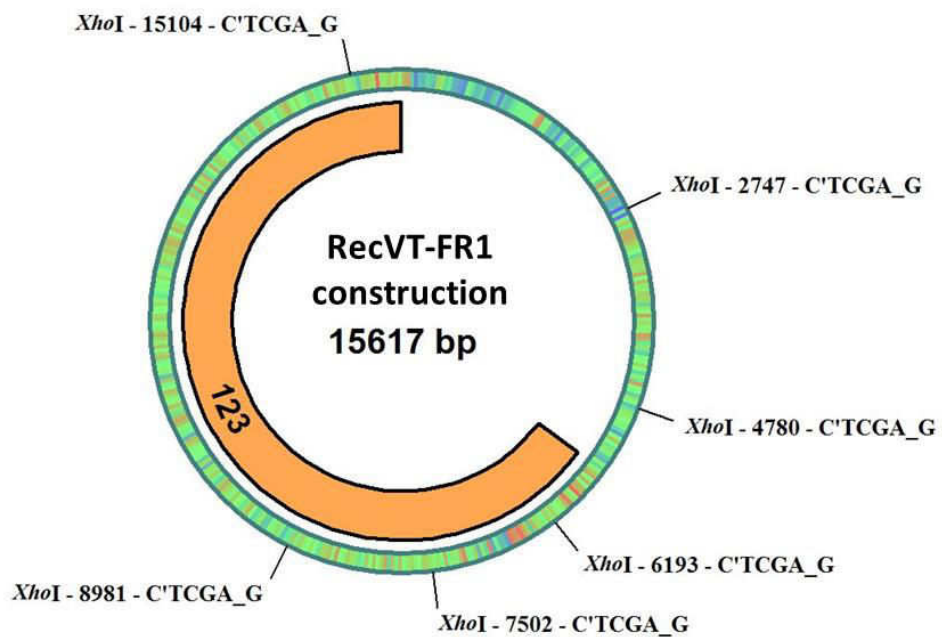


Figure 4: Plasmid constructions and chosen enzyme restriction sites.

A) plasmid construction with isolate DWV-Fr1, showing digestion sites for selected enzyme *EcoRI*. B) plasmid construction with isolate RecVT-Fr1, showing digestion sites for selected enzyme *XhoI*.

2.7. Infectivity tests and quantification

Still following protocol from (Desbiez et al., 2012), we decided to use a HandGun that was available and has been shown to be more efficient for plasmid inoculation in plants than injection (Fig. 5). We adapted the protocol from squash zucchinis to honeybee pupae. As this technique had, as far as we know, never been used before on honeybee pupae, we had to carry out some adjustments to determine the right HandGun shooting distance and pressure so as not to harm the pupae, which could cause necrosis. We determined to use 2cm high PVC tubes sections as adjustable and easily sanitized containers for 5 nymphs each, and shot at a pressure of 2 bar, 10 cm away from the pupae.

The same infectivity experiment was repeated once (first in October 2016, repetition in April 2017). A third infectivity test was carried out in May, but separating each obtained clone. They are described below.

The first infectivity test was conducted on honeybee pupae in October 2016 (Fig. 4). It was carried out on white to pink eyed pupae from a honeybee colony that had been tested as “DWV-low” ($<2,5 \times 10^6$ copies/bee) at the beginning of the season. For this first test, we mixed the well-constructed clones that seemed to be in the highest quantity (strongest bands on the restriction gel, Fig. 5). For DWV-Fr1, we used 2.5 μ L of each 85-1-II, 85-2-III, 85-3-II, and 85-3-III (Fig. 5). For RecVT-Fr1 we used 123-1-II, 123-2-II, 123-2-III, and 123-2-IV. The resulting 10 μ L of plasmid solution were added to 10 μ L of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and 10 μ L of M20 tungsten beads (Gal-On et al., 1995). Three μ L of this solution were then placed in the HandGun, to be pulverized 5 times over one batch of 5 pupae. Control conditions included non-inoculated pupae and “mock inoculated” pupae, inoculated with water, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1.25M and tungsten beads (= mock inoculated) (Gal-On et al., 1995). For each condition, 4 batches of 5 pupae were inoculated. After inoculation, pupae were kept at 34°C, with controlled humidity, in a confined incubator for 48h (in a C1 and C2 certified laboratory confinement, (Haut conseil des biotechnologies, 2013)). RNA was extracted from all 4 pools of 5 pupae per condition using a Qiagen RNeasy Universal Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer’s instructions. 50 μ l of the resulting RNA was quantified using a spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo

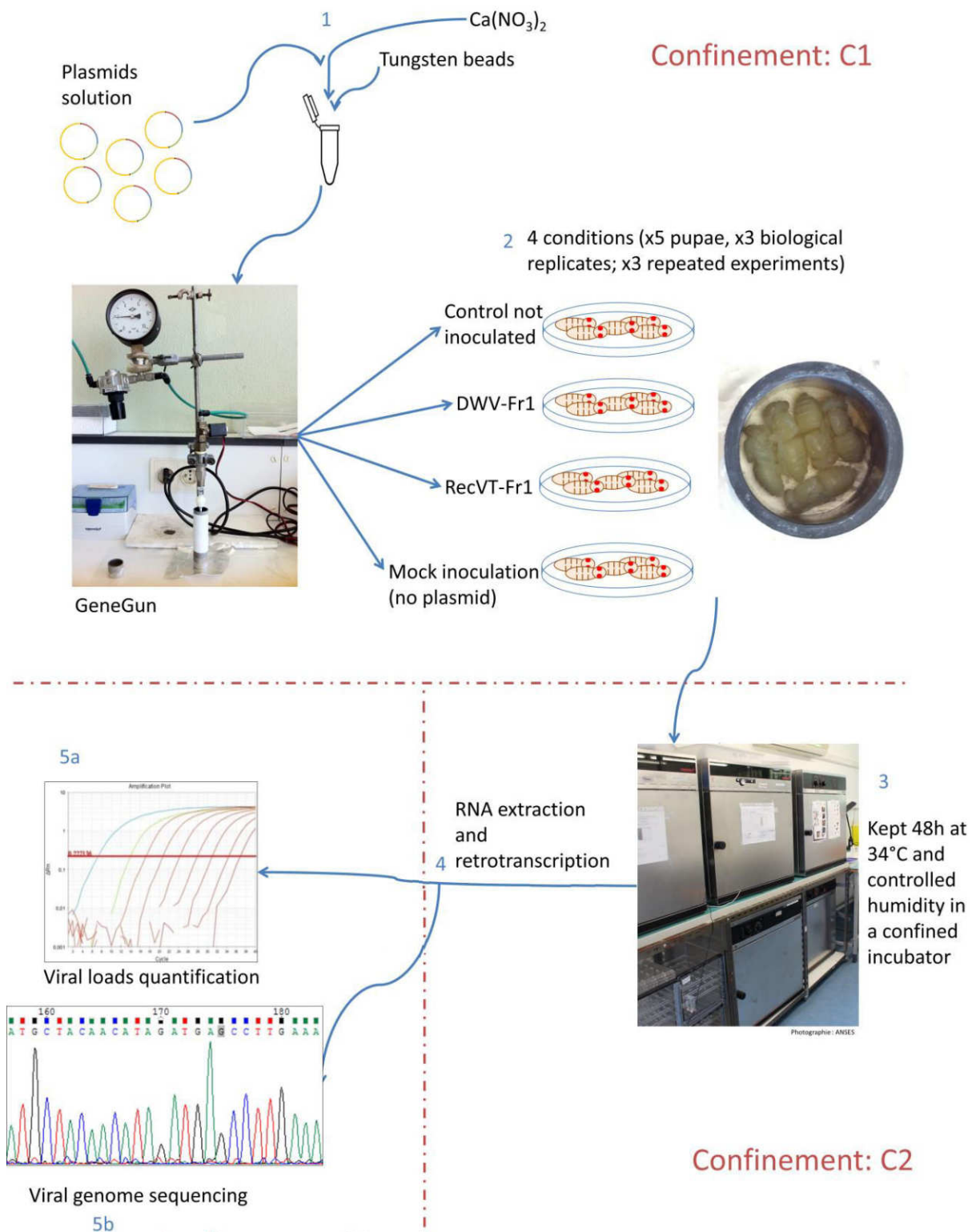


Figure 5: Summary diagram of the steps followed for infectivity tests; photography Anne Dalmon (Anses for the incubators).

Fisher Scientific) then diluted to obtain a 500 ng/μl RNA concentration. Obtained and diluted samples were stored at -80°C.

This infectivity test was carried out a second time following the same steps, in April 2017.

The third infectivity test was carried out using each construction separately to test if some constructions were infectious while others were not. There were 3 replicates for each condition, each containing 5 pupae. Pupae were sampled in one colony that had been tested as “low-DWV” in April. Control was not shot, Mock inoculated was shot with tungsten beads, Ca(NO₃)₂ and water, and the clone containing conditions were a 3 μL mix of each specific clone, tungsten beads, and Ca(NO₃)₂ as described above.

2.8. Control of clone multiplication

a) DWV quantification

DWV loads in all samples were quantified using a SYBR-Green quantitative real-time PCR absolute quantification (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) after a retro-transcription test, as described in Coulon et al (previous article).

Viral loads were converted to log₁₀ and compared using ANOVAs followed by Fisher’s LSD when data allowed for parametric tests or by Kruskal-Wallis tests followed by pairwise Wilcoxon tests with Bonferonni correction when they did not.

b) Sequencing

To control if the multiplied virus originated from the clones and was not a background DWV infection, we amplified by RT-PCR a specific region (Table 1) which is different between isolates DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 (around 5’ ITR region) (Dalmon et al., 2017). The amplicons were then sent for sequencing using the Sanger technology (Genoscreen, France) and sequences were cleaned, aligned using CLUSTAL (EMBL-EBI) to obtain a cleaner sequence and analysed using BLAST (NCBI, USA).

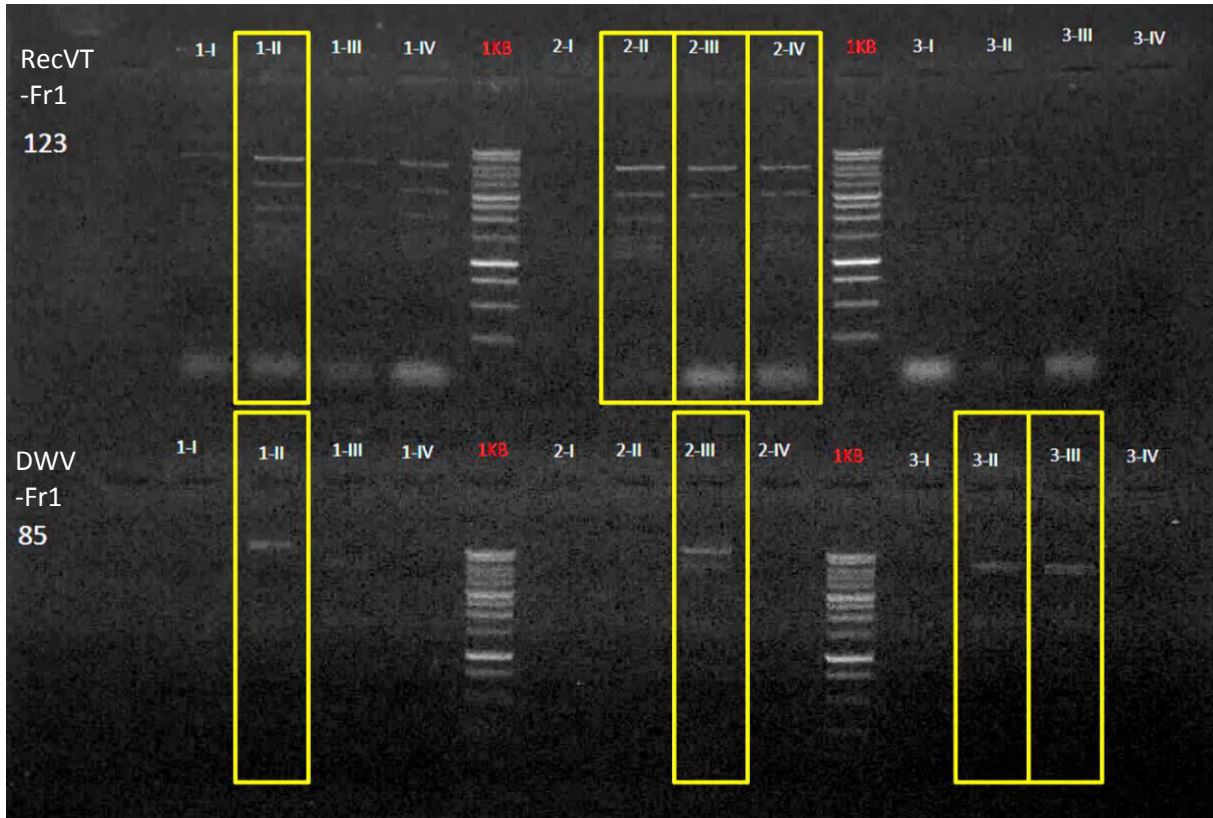


Figure 6: Plasmid constructions digestions.

For each isolate, 3 different samples were retrieved after the yeast ligation step (1, 2, 3), and then 4 different colonies selected after the *E.coli* transformation (I, II, III, IV). Red: 1 KB ladder. Yellow frames : chosen clones to be inoculated in infectivity tests.

c) Direct qPCR

A quantitative PCR was eventually carried out on the samples without the retro-transcription step to determine if the amplified DNA fragments corresponded to the initial inoculated plasmid or to cDNA transcribed from the plasmid.

3. Results and discussion

3.1. Obtained DWV clones

Constructed clones (Fig. 6) contain the whole DWV-Fr1 or RecVT-Fr1 DWV isolate genome (~10 kb), and pAGUS-1 plasmid with the 2 μ yeast replication origin and Trp-1 promoter. RecVT-Fr1-1-II, RecVT-Fr1-1-IV, RecVT-Fr1-2-II, RecVT-Fr1-2-III, and RecVT-Fr1-2-IV show the expected specific bands for a complete clone in the plasmid (1309 pb, 1413 pb, 1479 pb, 2033 pb, 3259 pb and 6123 pb), as well as DWV-Fr1-1II, DWV-Fr1-2-III, with DWV-Fr1-3-II and DWV-Fr1-3-III showing different bands (7191 pb, 5767 pb, 1787 pb and 865 pb). Indeed, some tested clones seemed to yield the expected profiles after digestion (Fig. 6). However, there seemed to be very little DNA as the bands aren't very visible. We have decided to test first with a mixture of clones for each isolates to overcome the lack of DNA.

For the rest of this study, and for each isolate, we have only tested the 4 complete clones that had the thickest bands in the digestion gel verification. For RecVT-Fr1 it was RecVT-Fr1-1-II, RecVT-Fr1-2-II, RecVT-Fr1-2-III, and RecVT-Fr1-2-IV. For DWV-Fr1 it was DWV-Fr1-1II, DWV-Fr1-2-III, with DWV-Fr1-3-II and DWV-Fr1-3-III.

Infectivity test in qRT-PCR (October 2016)

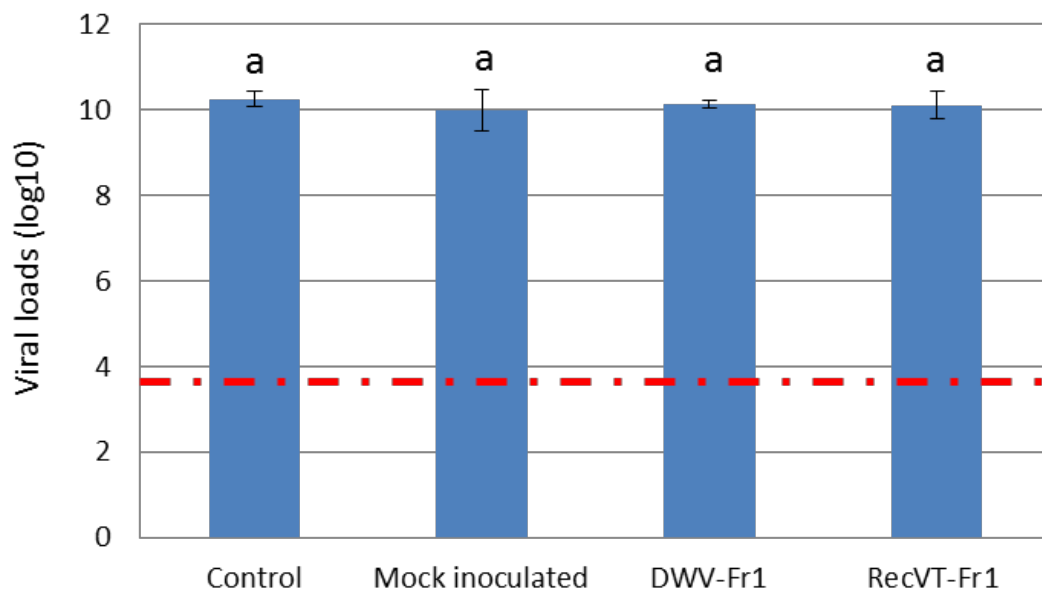


Figure 7: Viral loads in 1 μ g RNA of the tested honeybee pupae in October 2016 (1st infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)). Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate the absence of significant differences ($p > 0.05$) between groups.

3.2. Infectivity tests: viral quantification

Due to regulatory constraints, the first infectivity test was carried out in fall when we got the official authorization for such tests. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on four samples containing five pupae each.

In this first test (October 2016, Fig.7), we can see that even the control and mock inoculated pupae had high loads of DWV (over 10¹⁰ copies per individual). No treatment was significantly different from control ($p>0.05$). Unfortunately, autumn is the time of year when *Varroa* is at its highest numbers (Dainat et al., 2012a), then the pupae were already highly contaminated by DWV and no difference could be observed between the controls and plasmid inoculated pupae. An eventual infection caused by cDNA clone inoculation could have been masked by this extremely high background infection.

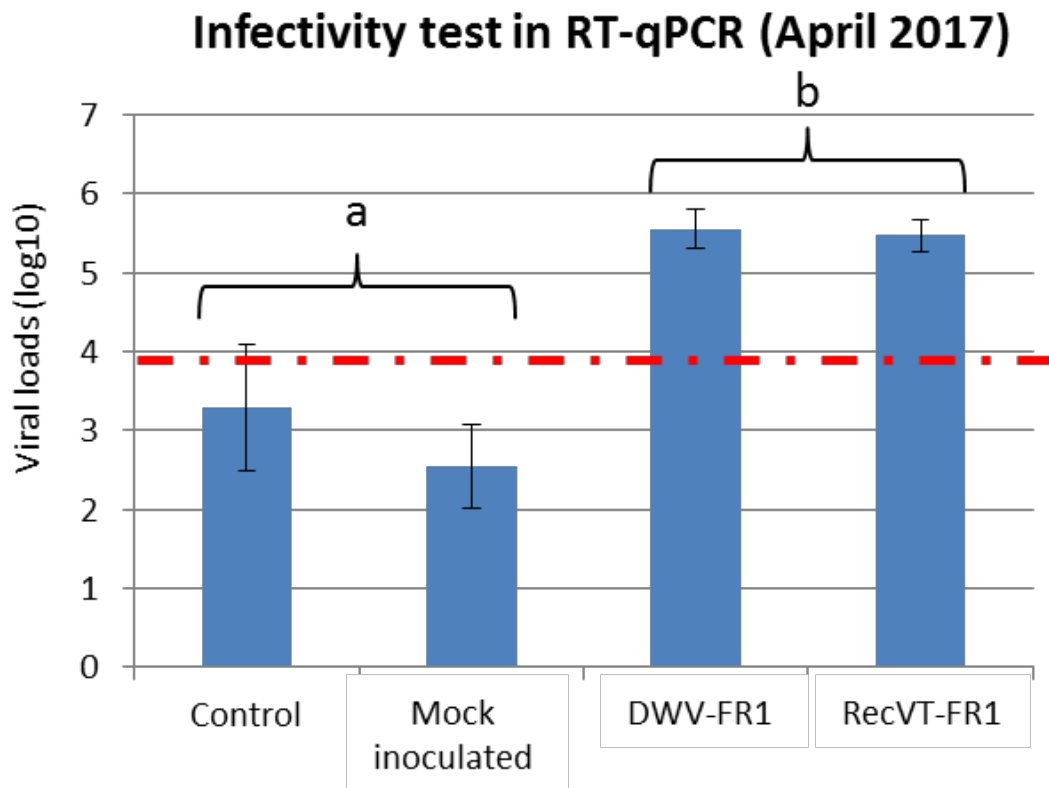


Figure 8: Viral loads in 1 μg RNA of the tested honeybee pupae in April 2017 (2nd infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)). Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate significant differences ($p > 0.05$) between groups.

The second infectivity test was carried out in April 2017, in the same way as autumn 2016. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on this time five samples containing five pupae each. This test shows a significant difference in the viral loads of the honeybees that were inoculated with the plasmids compared to the two controls (Fig. 8). Untreated control was not significantly different from mock inoculated ($p=0.231$), but was different from both DWV-Fr1 ($p<0.001$) and RecVT-Fr1 ($p<0.001$). DWV-Fr1 and RecVT-Fr1 did not show significant differences in between their viral loads ($p=0.995$).

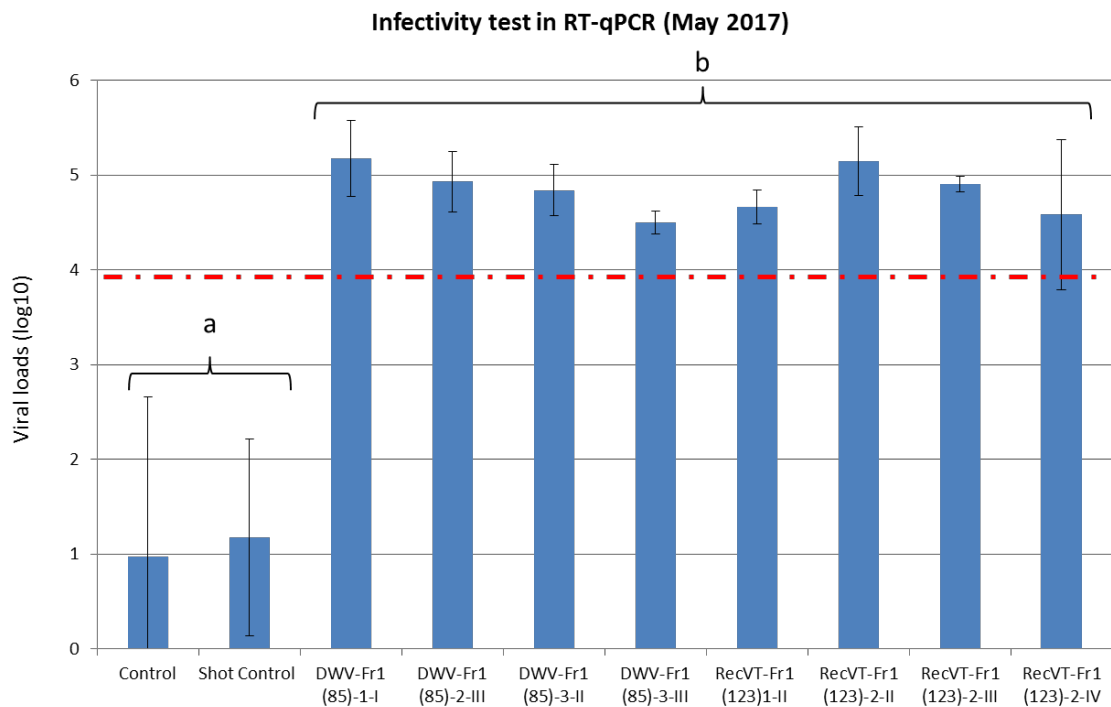


Figure 9: Viral loads in 1 μ g RNA of the tested honeybee pupae in May 2017 (3rd infectivity test).

Means of log₁₀ of viral loads and standard deviations are shown. Control was not inoculated while “Mock inoculated” was inoculated using Ca(NO₃)₂ and tungsten beads without plasmid. Conditions shown are Control (not treated), Mock inoculated (inoculated with water in place of clones), an equal mix of the selected clones for DWV-Fr1, or an equal mix of the selected clones for RecVT-Fr1. Letters indicate significant differences ($p > 0.05$) between groups. Red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV (equivalent to 31Ct (Miranda et al., 2013)).

The third infectivity test was carried out using each construction separately to test if some constructions were infectious while others weren't. Results are shown as the mean of log₁₀ of viral loads in 1µg RNA per µL of sample, calculated on this time five samples containing five pupae each. There was no difference between control and mock inoculated honeybees ($p=0.999$) (Fig. 9). Both control and mock inoculated pupae showed significantly lower DWV loads than every plasmid-inoculated pupae ($p<0.05$), but these conditions inoculated with the plasmids weren't different between each other ($p>>0.05$). Evidence of higher DWV loads in plasmid inoculated pupae suggests all cDNA clones used in this experiment were infectious. However, we had to perform additional verifications for confirmation.

4. [Infectivity tests: sequencing](#)

To verify if the qPCR amplified DNA from the pupae corresponding to the cloned viruses and not to the background DWV infection, 5' UTR region of DWV was amplified in samples obtained from each clone mixtures from the April 2017 experiment. Forward and reverse sequences of this region were obtained by Sanger sequencing, cleaned by hand, then aligned through CLUSTAL (EMBL-EBI) software to obtain a cleaner sequence with better identity (especially on the extremities). BLAST (NCBI) – powered alignments returned 99 % identity of isolate DWV-Fr1 with itself (sequence of uncloned DWV-Fr1, that had been previously entered in the NCBI database (genbank accession KX373899) (Dalmon et al., 2017). The isolate RecVT-Fr1 alignments returned 99 % of identity with the sequence of VDV1/DWVRecVT-Fr1 that was used to obtain the clone (genbank accession KX373900).

This first verification step seemed to confirm that we have amplified a virus genome region corresponding to the inoculated clones and not from the background DWV infection.

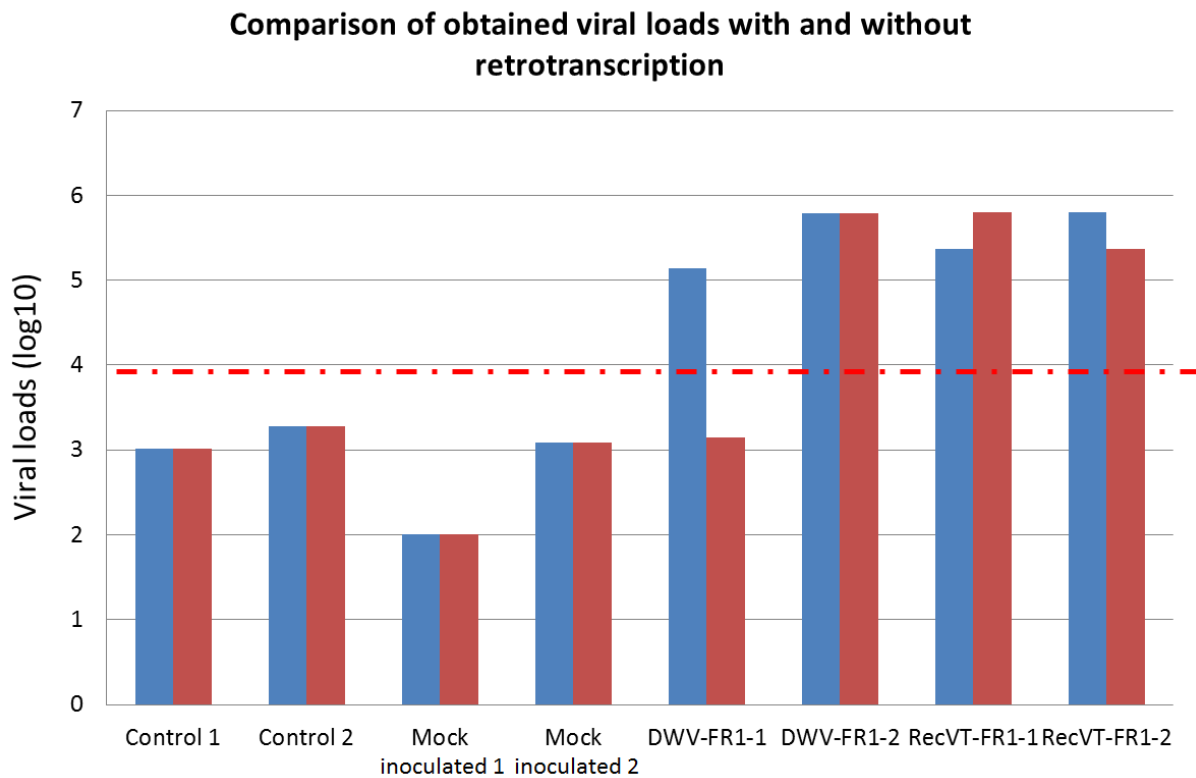


Figure 10: Comparison of the viral loads in 1 μ g RNA obtained from the 2nd infectivity test (April) in qPCR (red) or RT-qPCR (blue).

1 and 2 are technical replicates, control and mock inoculated pupae; DWV-Fr1, RecVT-Fr1: plasmid inoculated pupae. Log₁₀ of viral loads are shown for each of the tested samples, red dotted line shows qPCR limit of quantification for DWV.

5. Infectivity tests: verification

We performed direct qPCR with both RNA samples from the April 2017 infectivity test and cDNA from these samples. Doing qPCR without performing the retro-transcription step may allow to amplify possible residual DNA sequence from the plasmids, extracted with the RNA. As this was just a primary test, we only tested 2 randomly chosen samples out of the 5 tested for each condition. It seems that the viral loads obtained are mostly the same between the two quantifications (Fig. 10). This means that contrary to what we thought after analyzing the RT-qPCR quantification results, what was amplified was probably the viral DNA present in the plasmid constructions.

However, we still cannot rule out that our clones could have been infectious, and more tests are needed to confirm this hypothesis. Indeed we have seen the plasmid yield after extraction from bacteria was quite low and maybe our clones are indeed infectious, but there are few of them, and background DWV infection and residual plasmidic DNA could mask it. One way to confirm a possible infectivity would be by performing a number of successive inoculations in DWV-free pupae. By principle of dilution, after a number of back-inoculations in pupae, we should not be able to amplify the residual plasmidic DNA, and only amplify the cDNA of the retro-transcribed RNA if the clone is infectious.

We have produced two complete new clones of two different DWV strains, including a recombinant. For this we have used a novel technique for the production of honeybee virus cDNA clones by using a protocol developed on plant viruses (Desbiez et al., 2012). The clones that we have produced do not seem infectious at this point of our investigations, but further experimentations are needed before concluding. Our clones could not be infectious for two reasons: i) the promoter could not be functional in honeybees, ii) the promoter may function, but the viral proteins could be toxic to the *E. coli* we used to multiply the clones, hence reducing the yield too drastically for us to observe an amplification in the pupae; iii) lastly, the cloned sequence could correspond to a non-infectious part of the viral population. The promoter we used (35S) was indeed a plant promoter which, albeit very powerful and observed to function in bacteria, yeast (Desbiez et al., 2012), and even other eukaryotes, including mammals (Tepfer et al., 2004), is not specific for insects. In previous clone constructions, bacterial promoters were used (T7 (Lamp et al., 2016) and SP6 (Benjeddou et

al., 2002) promoters), the plasmids multiplied in *E. coli*, then transcribed into RNA *in vitro*, and the RNAs were inoculated. Strategies to overcome this problem would be to either exchange the 35S promoter with a promoter that is functional in honeybees, such as the CMV (cytomegalovirus) promoter (Youssef, 2016) or to perform *in vitro* transcription before inoculating them with RNA.

Another strategy, to obtain better plasmid yields, would simply be to increase the volume of bacterial culture with a new amplification step in *E. coli*. To avoid producing potential toxic proteins during this step, if this doesn't work, we could also return to the previous yeast homologous recombination step to add introns in the protein sequences. This strategy has successfully been used for the production of plant potyvirus clones (Desbiez et al., 2012). For this we should first try to uncover which protein is toxic to the bacteria, and add the introns in their sequences. This would allow the stabilization of the multiplication step, and thus a better clone yield.

In conclusion, we have completed the first step of developing a new technique for constructing cDNA clones of positive sense RNA viruses of the honey bee. Further experiments are needed to conclude on their infectivity.

Discussion générale

Dans un contexte de forts affaiblissements et de pertes de colonies, d'ubiquité des pesticides dans l'environnement, et d'émergences ou de réémergence de maladies virales, il est important de mettre en lumière le rôle que peuvent jouer les interactions entre facteurs de stress sur la santé de l'abeille domestique. L'objectif de cette thèse était d'étudier les interactions entre virus et pesticides afin de compléter les données encore parcellaires sur le sujet (cf Questions de recherche et objectifs de la thèse, p : 79).

Dans un premier temps, au cours d'expériences préliminaires, j'ai précisé les conditions d'exposition à ces facteurs biotique et abiotique. J'ai testé différentes méthodes d'infection expérimentale sur des abeilles émergentes. Une méthode de transmission du CBPV par contact entre abeilles préalablement inoculées par injection et abeilles saines a été développée avec succès au laboratoire (Chapitre 1, 1, p : 87). Elle permet d'éviter efficacement chez les abeilles étudiées en cagette les stress liés à l'injection du virus et donc de diminuer les biais expérimentaux en se rapprochant au plus près de la voie principale de transmission du virus dans les colonies. Ce mode de transmission par contact n'étant pas envisageable pour les expérimentations avec le DWV, nous avons recherché une méthode d'inoculation moins invasive que l'injection, en testant la transmission par voie orale. Même à de fortes doses (environ 10^8 copies de virus ingérées par abeille) nous n'avons pas pu déclencher d'infection par la voie orale, puisque les charges virales n'ont pas augmenté (Chapitre 2, 1, p : 157). Cependant, cela ne signifie pas que cette voie de transmission ne soit pas possible en conditions naturelles. En effet, nous n'avons testé que l'administration d'une seule dose « aigue » de virus donnée aux abeilles âgées d'un jour, et contrôlé les charges virales 24 et 48 h après inoculation, ce qui pourrait s'avérer trop précoce pour observer la multiplication du virus. Une étude précédente avait par exemple conclu qu'une infection par voie orale à 10^7 copies par abeilles était efficace et faisaient augmenter les charges virales sur abeilles adultes 9 jours après l'inoculation (Doublet et al., 2015b). Cependant, nous n'avons pas non plus observé d'effet significatif sur les mortalités, et ce jusqu'à 51 jours post inoculation. Une autre explication à l'absence d'efficacité de la transmission orale du DWV lors de nos essais pourrait être une surestimation de la charge en virus infectieux dans l'inoculum par PCR

quantitative (qui mesure les quantités de génomes viraux mais pas le nombre de particules infectieuses).

Afin de s'approcher des conditions d'exposition dans les colonies, où les abeilles sont en permanence en contact avec le virus *via* les fèces ou la trophallaxie, il pourrait être intéressant d'effectuer des infections de ce type sur une durée plus longue. Cela permettrait de mieux caractériser la transmission horizontale du DWV en l'absence de *Varroa* (Forsgren et al., 2012). Cependant ceci serait difficilement applicable de façon contrôlée en ruche (nécessité de recapturer les abeilles régulièrement ou de les confiner dans la ruche en contrôlant leurs apports alimentaires). Par ailleurs, la propagation et la réplication du DWV dans l'abeille sont mal connus. Suite à une infection orale, il a été observé que le DWV se concentrait dans l'intestin de l'abeille (Doublet et al., 2015b; Möckel et al., 2011). Cependant, dans le cas d'une injection il s'établit également dans la tête (Yue and Genersch, 2005), ce qui corrobore les effets neurologiques déjà observés dans le cadres d'infections expérimentales (Iqbal and Mueller, 2007). Une expérience utilisant par exemple la technique d'hybridation *in situ* d'amorces fluorescentes (FISH), couplée à de la microscopie sur des coupes d'abeille entière ou des dissections d'organes plus spécifiques, pourrait donner des réponses plus définitives sur les sites de la réplication en fonction du type d'infection et des souches virales étudiées.

Le développement d'un clone infectieux du DWV que nous avons amorcé lors de cette thèse (Chapitre 2, 2, p : 191) pourrait être utilisé dans ce type d'expérience. Il permettrait d'étudier avec plus de finesse cette transmission en produisant une quantité importante de la souche virale d'intérêt, non contaminée par d'autres virus ou souches. Ce clone moléculaire permettra également des études sur les mécanismes d'infection du virus au niveau cellulaire, qui sont pour l'instant inconnus. Cependant il est nécessaire pour cela d'avoir des lignées cellulaires d'*Apis mellifera* viables, ce qui n'est pour l'instant pas le cas. Connaître les cellules ciblées par le virus ainsi que son mode d'infection pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les interactions avec les pesticides ; en effet si les deux facteurs ciblent les mêmes cellules cela pourrait expliquer les effets observés en co-exposition.

Si les mécanismes d'action des pesticides sont bien décrits, leur métabolisation voire les effets adverses des métabolites ne restent que partiellement connus. Ainsi, la métabolisation du thiaméthoxam n'avait à notre connaissance encore jamais été suivie en conditions

d'exposition chronique à des doses sublétales. En effet, une exposition chronique des abeilles en conditions naturelles est probable par la concentration des pesticides par les colonies, à travers la constitution des réserves de pollen et nectar, ainsi que les cires (Poquet et al., 2016). Mes travaux ont démontré que le thiaméthoxam est rapidement et efficacement métabolisé en clothianidine par l'abeille domestique (Chapitre 1, 2, p : 93). Il a également été déterminé qu'une grande partie de cette clothianidine se retrouve dans l'ampoule rectale des abeilles même après une exposition continue au thiaméthoxam pendant 18 jours, un temps équivalent environ aux deux tiers de la vie d'adulte de l'abeille (en saison apicole). Cette localisation de la clothianidine dans l'ampoule rectale suggère qu'elle n'est pas re-mobilisable (du Rand et al., 2017), et qu'en conditions naturelles elle serait rapidement excrétée par les abeilles. Ces résultats suggèreraient l'invalidité de l'hypothèse selon laquelle les effets du thiaméthoxam mesurés sont en fait ceux de la clothianidine (Benzidane et al., 2010).

Les réponses à ces premières questions m'ont permis de définir des plans expérimentaux proches de scénarios réels de co-expositions des abeilles dans les colonies. J'ai ainsi suivi deux axes : un premier en exposition chronique et en conditions contrôlées en laboratoire (pour le CBPV), et un deuxième en exposition aigüe et conditions les plus naturelles possibles dans les colonies (pour le DWV). Nous avons choisi d'exposer les abeilles au thiaméthoxam uniquement par voie orale, puisqu'il est principalement utilisé comme pesticide systémique plutôt qu'en vaporisation, et se retrouve donc en priorité dans le pollen et nectar que les butineuses ramènent à la ruche, où les autres ouvrières seront également exposées. Nous avons ainsi pu observer dans les deux cas des interactions (additives ou synergiques) ayant un effet délétère sur différents traits des individus.

En premier lieu, l'effet synergique à forte dose (5 ng de thiaméthoxam par abeille) sur la mortalité, observé ou non en fonction de l'expérience, pourrait refléter des différences de tolérance individuelle chez certaines des abeilles testées (Chapitre 1, 2, p : 93). Certaines abeilles multiplieraient plus efficacement le virus, conduisant à des charges virales plus élevées dans les abeilles ayant succombé à la co-exposition, alors que les charges virales des abeilles survivantes restaient identiques quelque soient les modalités d'exposition ou co-exposition. D'autres toléreraient une augmentation des charges virales, puisque lors d'une deuxième expérience la mortalité n'a pas été affectée lors de la co-exposition, alors que les charges virales ont augmenté sous l'effet du pesticide (Chapitre 1, 3, p : 123). Notamment, les charges virales dépassaient le seuil de développement des symptômes de la paralysie

chronique, soulignant l'existence d'un effet de déclenchement d'infections apparentes par le pesticide. Certaines abeilles parmi les survivantes présentaient effectivement des symptômes typiques de la paralysie chronique, tels que des tremblements ou un abdomen distendu (signes cliniques observés lors d'expérimentations en cagette - mais non mesurés objectivement).

Les différences observées entre les deux expériences soulignent, bien qu'elles aient été réalisées en laboratoire, l'importance des variations individuelles et des conditions environnementales s'appliquant aux colonies dont proviennent les abeilles. Ainsi toutes les colonies et les individus qui les composent ne sont pas égaux face aux stress. En effet, comme il a été discuté précédemment (Chapitre 1, 3, p : 123) les colonies dont provenaient les abeilles n'étaient pas dans les mêmes conditions pour chaque expérience. Les premières expérimentations avaient utilisé des abeilles issues de colonies « au champ », en été, se nourrissant d'elles-mêmes ; alors que la seconde expérience recourait à des abeilles provenant de colonies conservées à l'intérieur d'un rucher hivernal à température constante, avec un nourrissage contrôlé. Il a en effet été observé des effets de la température sur la physiologie des abeilles (Bordier et al., 2017), et il a été observé une transmission possible de pathogènes à travers la nourriture (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010). La qualité de la nourriture, contrôlée ou non suivant nos expériences, est également connue pour avoir des effets significatifs sur les colonies et individus (Alaux et al., 2010b; Di Pasquale et al., 2013; Huang, 2012; Mao et al., 2013). Il a également été discuté (Chapitre 1, 2, p : 93) que des différences de fond génétique pourraient influencer sur la tolérance, comme il a été observé chez la drosophile (Corby-Harris et al., 2007).

Cette tolérance plus ou moins forte expliquerait le fait que certaines colonies pourraient être plus susceptibles, après une exposition à un stress tel qu'un pesticide, de déclarer des infections avec symptômes visibles et caractérisés, voire de dépasser un seuil (théorique) de non-retour pouvant conduire à une perte de la colonie (Bryden et al., 2013; Nazzi et al., 2012).

A ces effets observés en laboratoire s'ajoutent des effets sur le comportement observés *in situ*, c'est-à-dire en conditions naturelles directement dans les colonies, cette fois ci avec le thiaméthoxam en exposition aigue et en interaction avec le DWV (Chapitre 2, 1, p : 157). L'effet négatif du thiaméthoxam à faible dose sur les retours à la ruche démontré par (Henry et al., 2012) a été également observé lors de mes travaux. Un effet synergique de la co-

exposition est aussi observé sur l'âge de première sortie de butinage, extrêmement précoce pour les abeilles co-exposées au thiaméthoxam à raison de 1 ng par abeille. Dans les conditions environnementales, ces synergies peuvent être lourdes d'impact. En effet, compte tenu de l'utilisation intensive du thiaméthoxam (Efsa, 2013), les abeilles ont une forte probabilité d'y être exposées au moins une fois dans leur vie. Les doses que nous avons testées, voire des doses plus élevées, ont été décelées dans différentes espèces végétales, dans les conditions environnementales (Botías et al., 2015; Efsa, 2013). Dans un même temps, la présence ubiquitaire de *Varroa* dans le monde et sa capacité à multiplier et ensuite transmettre le virus par injection entraîne une forte prévalence du DWV qui augmente la probabilité d'une co-exposition naturelle au virus et au thiaméthoxam. Les effets négatifs de la co-exposition pourraient ainsi être assez répandus dans les colonies d'abeilles domestiques. De plus, ces effets pourraient impacter la dynamique de développement de la colonie, comme démontré par (Henry et al., 2016).

Comme indiqué dans l'*Introduction générale* (§ 1, p : 19), les abeilles se répartissent les tâches dans la ruche selon un polyéthisme d'âge, où les plus jeunes s'occupent du couvain quand les plus vieilles butinent, en passant par d'autres castes entre ces deux extrêmes (Winston, 1987). Cependant, les âges auxquels elles passent d'une caste à l'autre peuvent changer en fonction des conditions dans laquelle la ruche se trouve, et surtout de la taille de la population. Plus la population est forte, plus elles auront tendance à devenir butineuses tard dans leur vie, tant que le nombre de butineuses est suffisant pour subvenir aux besoins de la colonie (Perry et al., 2016). Si les abeilles quittent la ruche à des âges très précoces, souvent sans revenir (elle ne sont pas adaptées physiologiquement aux tâches d'une butineuse (Vance et al., 2009)), cela peut entraîner un cercle vicieux où un nombre plus important d'abeilles vont devenir à leur tour butineuses afin de les remplacer (Robinson, 1992). Ceci va affaiblir la colonie en poussant des abeilles de plus en plus jeunes et de moins en moins « qualifiées » à aller butiner, diminuant les performances de collecte de nourriture, ce qui diminuera la résilience de la colonie, et pourra à terme entraîner son effondrement (Perry et al., 2016). On retrouve ici la notion d'équilibre des colonies, et d'un seuil spécifique pouvant entraîner son déclin s'il est atteint suite à des conditions défavorables à la colonie (Bryden et al., 2013). Cet équilibre est d'autant plus précaire que les colonies peuvent être infectées par plusieurs virus en même temps (Chen et al., 2004), et bien sûr être exposées à plusieurs pesticides (notamment des fongicides, très présents en agriculture). Par exemple, la co-exposition au

champ à du boscalide et du thiaméthoxam double les effets délétères de ce dernier sur les mortalités, l'immunité sociale et la perte de reines (Tsvetkov et al., 2017)).

Afin de comprendre les processus impliqués dans les effets délétères observés lors de co-exposition, j'ai étudié la transcription de gènes liés à l'immunité et la détoxification dans les deux expériences (co-exposition du thiaméthoxam avec le CBPV ou le DWV). J'ai par exemple confirmé avec le CBPV les observations effectuées par Nazzi et al., 2012 concernant le facteur *dorsal-1a*, facteur de transcription permettant de contrôler les infections virales, qui avait été observé comme régulé négativement en présence de DWV. Ce gène était également régulé négativement par l'exposition au pesticide, ce qui avait été observé précédemment avec la clothianidine par (Di Prisco et al., 2013), et relié, comme lors de mon expérience avec CBPV, avec une augmentation des charges virales. Dans le cas de la co-exposition avec DWV, ces effets n'ont pas été observés ; cependant les abeilles étaient déjà naturellement déjà infectées par le DWV, ce qui peut biaiser ces résultats, le gène pouvant être déjà impacté par cette infection dans toutes les conditions testées. Finalement j'ai mis en évidence que l'infection virale par le CBPV avait un effet négatif sur des gènes liés à la détoxification. Néanmoins, un suivi de la métabolisation du thiaméthoxam dans le cadre d'une co-exposition n'a pas mis en évidence d'effet sur la cinétique de détoxification. Il pourrait exister d'autres voies que nous n'avons pas testées. Dans les deux expériences, j'ai observé une diminution significative de la transcription de la vitéllogénine causée par l'infection virale. Dans le cas de l'expérience utilisant le DWV, j'ai pu relier ce résultat aux sorties précoces précédemment citées, la vitéllogénine. Cette protéine entre en jeu dans la régulation du vieillissement chez l'abeille ; lorsque sa quantité diminue, l'abeille progresse dans les castes de façon plus précoce (Amdam, 2011). L'analyse de ces premiers résultats montre la nécessité d'études plus exhaustives de la transcription de gènes de la détoxification comme de l'immunité. Il faudrait en premier lieu tester d'autres représentants de la famille CYP450 (voir *Introduction générale*, § 6, d, p : 69), ou utiliser la technique du séquençage des ARN transcrits (RNA-seq) sur de nouveaux échantillons, ce qui pourrait nous permettre de mettre en lumière d'autres voies de détoxification.

Enfin, la séquence des co-expositions n'a pas été étudiée. En effet, dans toutes les expériences présentées dans cette thèse, les abeilles étaient exposées simultanément au pesticide et au virus. Dans les colonies, les abeilles pourraient être infectées par le virus d'abord, puis exposées aux pesticides ; l'inverse pourrait aussi être vrai, concernant des pesticides contenus

dans les cires ou dans les pollens. L'étude de ces différentes séquences permettrait d'évaluer de façon exhaustive l'effet des co-expositions. Des études ont précédemment démontré par exemple que des abeilles infectées par *Nosema ceranae*, puis exposées au DWV présentaient, 4 jours plus tard, des charges virales moindres comparées aux abeilles exposées d'abord au DWV puis à *N. ceranae*, et plus faibles encore que celles exposées uniquement au DWV au même âge (Doublet et al., 2015b). En plus de nous renseigner sur les effets de séquence, cette expérience suggère qu'une interaction entre le DWV et *N. ceranae* pourrait être de nature antagoniste, et que les deux pathogènes pourraient partager les mêmes sites d'infection. Une autre étude a démontré que des abeilles infectées par *N. ceranae* et exposées au fipronil présentaient un effet synergique de la co-exposition sur la mortalité, quel que soit l'ordre suivant lequel les stress étaient appliqués (Aufauvre et al., 2012).

Les interactions observées lors de mes expérimentations pourraient être expliquées par les réponses générales mises en place par l'abeille pour résister au stress immunitaire et au stress provenant du thiaméthoxam. En effet, les pesticides représentant un stress relativement récent à l'échelle de l'évolution des espèces, les abeilles n'ont pas encore, à notre connaissance, développé d'adaptations spécifiques à ce stress (Bordier et al., 2017), bien qu'elles possèdent un système de métabolisation des xénobiotiques fonctionnel (Berenbaum and Johnson, 2015). En dépit d'avoir recherché des effets du thiaméthoxam et même de l'infection virale sur certains composants de ce système de métabolisation des xénobiotiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence une réponse spécifique répétable au thiaméthoxam. Les réponses aux infections, bien que correspondant à ce qui avait déjà été démontré dans la littérature, semblent relever elles aussi de l'immunité générale, avec par exemple les diminutions de transcription de *vitellogénine* et de *dorsal-1a* qui se retrouvent lors de chaque exposition au virus, mais aussi pour *dorsal-1a* lors de l'exposition chronique au thiaméthoxam. Les virus ont également été observés comme pouvant déclencher la plupart des réponses immunitaires présentes chez l'abeille, sans distinction (Brutscher et al., 2015). La réponse comportementale de sorties précoces que nous avons observée avait également été précédemment rapportée lors d'une exposition au DWV seul (Benaets et al., 2017), mais aussi sous des pressions très fortes d'infestations à *Varroa* (Downey et al., 2000), des infections à *Nosema apis* (Wang and Moeller, 1970), ou une anesthésie au CO₂ au début de leur vie (Woyciechowski and Moron, 2009). L'abeille semble donc présenter des réponses plutôt non spécifiques aux stress testés.

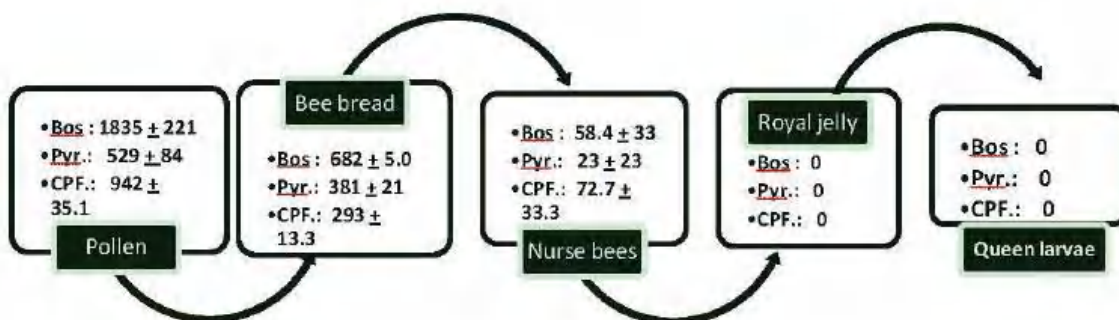


Figure 30 : Dilution des quantités en pesticides dans les colonies d'*Apis mellifera* (Degrandi-hoffman et al., 2013).

Bos = boscalide (fongicide), Pyr=pyraclostrobine (fongicide), CPF= chlorpyrifos (insecticide organophosphoré). Quantités données en ppb (partie par milliard).

Des approfondissements sur les différentes réponses, capacités de résistance ou tolérance aux xénobiotiques de l'abeille domestique sont encore nécessaires, quoique déjà abordées par (Laurino et al., 2013; Rinkevich et al., 2015), mais à notre connaissance pas encore étudiées dans le cas des infections virales. Le génome de l'abeille n'a été séquencé que récemment (2006), et la caractérisation des différentes populations génétiques se développe (Weinstock et al., 2006; Wragg et al., 2016). Des expérimentations sur la sensibilité aux infections virales d'abeilles dont le fond génétique est connu pourront faire avancer les connaissances sur le sujet.

De façon plus large, la question de ces interactions se pose pour tous les pollinisateurs en général, mettant en danger les cultures qui, comme il a été expliqué, ne dépendent pas uniquement du service de pollinisation de l'abeille domestique. En effet, les néonicotinoïdes, dont le thiaméthoxam, et nombre d'autres pesticides sont à ce jour présents et persistants dans plusieurs compartiments écologiques tels que les eaux de surface (Miranda et al., 2011), les eaux profondes (van der Sluijs et al., 2013) ; les sols (Bonmatin et al., 2015), et réincorporés dans les plantes, cultivées ou non, qui y poussent (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012). De ce fait, les abeilles domestiques mais également tous les pollinisateurs ont une très grande probabilité d'entrer en contact ou d'ingérer ces pesticides. Des effets négatifs ont déjà été observés chez le bourdon exposé à l'imidaclopride, qui cause une baisse du taux de développement des colonies et de la production de reines (Whitehorn et al., 2012). Une autre étude, en champs traités avec un mélange de clothianidine et d'un pyréthroïde, a observé sur les bourdons également une baisse du développement des colonies, mais aussi une baisse du taux de nidification d'une espèce d'osmie, ainsi qu'une baisse de la densité d'abeilles sauvages butinant les parcelles (Rundlöf et al., 2015).

Cette ubiquité est en réalité d'autant plus dommageable pour les pollinisateurs sauvages (Rundlöf et al., 2015) que pour l'abeille domestique, car contrairement aux colonies d'*Apis mellifera*, les abeilles sauvages ne possèdent pas de colonie, ou alors des colonies non pérennes (une saison pour une colonie de bourdons (Derveau, 2015)). L'absence d'une organisation sociale en colonie ne permet donc pas aux pollinisateurs sauvages de bénéficier de l'effet tampon du nombre d'individus, ce qui rend la perte d'individus solitaires plus dommageable pour la population, ni de l'effet de dilution des pesticides dans les nectars et pollens observés le long des échanges entre castes chez l'abeille domestique (pollué chez les

Detection and proof of infection or replication of honey bee viruses in managed and wild pollinator insects. (See below-mentioned references for further information.)

	DWV/VDV-1	BQCV	ABPV/KBV/ IAPV	SBV /CSBV	CBPV	SBPV	LSV1/LSV2	AmFV	ALPV	BSRV	BeeMLV	References
<i>A. mellifera</i> *	++	++	+++/>++	++	++	++	++	++	++	+	++	Bailey, 1965; Bailey et al., 1963; Bailey et al., 1964; Bailey and Woods, 1974; Bailey and Woods, 1977; Bowen-Walker et al., 1999; Chen et al., 2004; Clark, 1978; Gauthier et al., 2011; Granberg et al., 2013; Maori et al., 2007; Ravoet et al., 2014; Ravoet et al., 2015a; Ravoet et al., 2013; Runckel et al., 2011
<i>A. cerana</i> *	++	++	+/>++/>++	++	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Al et al., 2012; Allen and Ball, 1995; Bailey et al., 1982; Forsgren et al., 2015; Kojima et al., 2011; Wang et al., 2015
<i>B. agrorum</i>	Ø	Ø	++/>Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. atratus</i>	+	+	+/>-/>-	+	-	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Gamboa et al., 2015; Reynaldi et al., 2013
<i>B. hortorum</i>	Ø	+	++/>Ø/Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. huntii</i>	++	++	Ø/Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Li et al., 2011; Peng et al., 2011
<i>B. ignitus</i> *	+	+	Ø/+/+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Choi et al., 2010
<i>B. impatiens</i> *	+	+	+/>+/+	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Levitt et al., 2013; Sachman-Ruiz et al., 2015; Singh et al., 2010
<i>B. lapidarius</i>	+	+	+/>Ø/Ø	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	-	+	Fürst et al., 2014; McMahon et al., 2015; Parmentier et al., 2016
<i>B. lucorum</i> *	+	+	++/>Ø/Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964; Fürst et al., 2014; McMahon et al., 2015
<i>B. pascuorum</i>	++	+	+/>Ø/Ø	Ø	Ø	+	++	Ø	Ø	-	+	Genersch et al., 2006; McMahon et al., 2015; Parmentier et al., 2016
<i>B. pratorum</i>	Ø	Ø	Ø/Ø/Ø	Ø	Ø	-	+	Ø	Ø	-	+	Parmentier et al., 2016
<i>B. ruderarius</i>	Ø	Ø	++/>Ø/Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964
<i>B. ternarius</i>	+	+	Ø/+/+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Singh et al., 2010
<i>B. terrestris</i> *	++	+	+++/>++/>++	+	+	++	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Bailey and Gibbs, 1964; Choi et al., 2015; Choi et al., 2010; Fürst et al., 2014; Genersch et al., 2006; Meeus et al., 2014; Niu et al., 2016
<i>B. vagans</i>	+	+	Ø/+/+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Singh et al., 2010
<i>M. scutellaris</i> *	-	-	+/>-/>-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ueira-Vieira et al., 2015
<i>O. cornuta</i> *	++	+	-/>-/>-	-	-	-	++	+	-	-	+	Mazzei et al., 2014; Ravoet et al., 2014; Ravoet et al., 2015a
<i>O. bicornis</i> *	+	-	-/>-/>-	-	-	-	+	+	-	-	+	Ravoet et al., 2014

Note: (+), molecular detection of viral genomes; (++) proof of viral replication; (-), not yet detected; (Ø), not yet analyzed; DWV, deformed wing virus; VDV-1, *Varroa destructor* virus-1; ABPV, acute bee paralysis virus; SBV, sacbrood virus; CSBV, Chinese sacbrood virus; IAPV, Israeli acute paralysis virus; CBPV, chronic bee paralysis virus; KBV, Kashmir bee virus; SBPV, slow bee paralysis virus; LSV, Lake Sinai virus strain 1 and strain 2; AmFV: *Apis mellifera* filamentous virus; ALPV, aphid lethal paralysis virus; BSRV, Big Sioux River virus; BeeMLV, Bee Macula-like virus; *A. mellifera*, *Apis mellifera*; *A. cerana*, *Apis cerana*; *B. agrorum*, *Bombus agrorum*; *B. atratus*, *Bombus atratus*; *B. hortorum*, *Bombus hortorum*; *B. huntii*, *Bombus huntii*; *B. ignitus*, *Bombus ignitus*; *B. impatiens*, *Bombus impatiens*; *B. lapidarius*, *Bombus lapidarius*; *B. lucorum*, *Bombus lucorum*; *B. pascuorum*, *Bombus pascuorum*; *B. pratorum*, *Bombus pratorum*; *B. ruderarius*, *Bombus ruderarius*; *B. ternarius*, *Bombus ternarius*; *B. terrestris*: *Bombus terrestris*, *B. vagans*, *Bombus vagans*; *M. scutellaris*, *Melipona scutellaris*; *O. cornuta*, *Osmia cornuta*; *O. bicornis*, *Osmia bicornis*; managed and commercialized species are highlighted by an asterisk.

Figure 31 : Détection et infection par les virus de l'abeille domestique dans des abeilles sauvages et autres pollinisateurs proches testés.

(+) détection, (++) preuve de réplication, (-) non encore détecté, (Ø) non encore analysé (Gisder and Genersch, 2017).

butineuses, puis de moins en moins jusqu'à la reine et les larves (figure 30) (Degrandi-hoffman et al., 2013). Les colonies d'abeilles domestiques seraient donc, par leur organisation, plus tolérantes aux expositions aux pesticides que les abeilles solitaires.

De plus, les virus généralement nommés « virus de l'abeille » ne sont pas forcément spécifiques d'*Apis mellifera*. En effet, le DWV par exemple est à présent reconnu comme étant un virus possédant un large spectre d'hôtes plutôt que comme un virus de l'abeille domestique uniquement (figure 30). Le virus a été retrouvé chez dix espèces de bourdons et deux espèces d'osmies, et pourrait se répliquer chez *Apis mellifera*, mais aussi *A. cerana*, trois espèces de bourdons et une espèce d'osmie (*Osmia cornuta* – figure 31) (Gisder and Genersch, 2017). Ce spectre est d'autant plus potentiellement large que la réplication est également effective chez l'acarier *Varroa destructor*, de la classe des arachnides, bien éloigné des insectes hyménoptères (Yue and Genersch, 2005). Le CBPV a également été découvert dans des fourmis (Celle et al., 2008). De plus, la détection des virus recherchés par PCR ou qPCR pourrait sous-estimer les infections et transmissions à d'autres hôtes compte tenu de l'existence de variants (Mordecai et al., 2015) et de recombinants (Dalmon et al., 2017).

Indépendamment de la notion de réservoir naturel, l'abeille domestique est de plus en plus pointée du doigt, avec d'autres pollinisateurs devenus domestiques (quelques espèces de bourdons, l'abeille *Melipona sp.*, une espèce d'osmie) (Gisder and Genersch, 2017), pour sa capacité à répandre des virus dans l'environnement. En effet la domestication concentre les individus et donc les maladies, augmente leur prévalence et rend plus facile la transmission au sein des populations domestiquées, également par la potentielle baisse de diversité génétique entre les colonies (Colla et al., 2006). Les pollinisateurs domestiques ils pourront ainsi transmettre les virus de façon passive à travers le pollen (Mazzei et al., 2014; Singh et al., 2010) ou le dépôt de fèces sur les fleurs (Rivière et al., 2007), par exemple.

De fait, l'omniprésence des virus et des pesticides dans l'environnement des abeilles sauvages suggère fortement que les co-expositions sont tout aussi probables que comme nous l'avons démontré dans les colonies d'abeilles. Une méta-analyse suggère que la corrélation générale entre les résultats obtenus sur *Apis mellifera* et ceux sur abeilles sauvages est plutôt bonne,

mais il reste nécessaire de développer des protocoles d'études sur d'autres espèces, en commençant tout d'abord par exemple par celles déjà ou en voie de domestication.

En conclusion, les résultats obtenus lors de cette thèse complètent le corpus de preuves sur la dangerosité des néonicotinoïdes pour les abeilles, en ajoutant à la longue liste des effets connus leur capacité à aggraver voire à potentialiser (par des interactions synergiques) des infections virales déjà présentes chez l'abeille, même à des doses environnementales n'ayant que peu voire pas d'effet mesurés seules. Par ailleurs, ces expériences soulignent qu'il est nécessaire de prendre en compte non seulement les facteurs de stress de l'abeille et l'abeille elle-même, mais également sa colonie d'origine et son environnement. Enfin, l'observation d'effets délétères lors des co-expositions renforce la nécessité de tester les effets cocktails de pesticides, puisque beaucoup d'entre eux peuvent se retrouver simultanément dans l'environnement de l'abeille. Il a notamment été démontré des interactions de certains insecticides retrouvés dans les ruches avec des acaricides utilisés pour lutter contre le *Varroa* (Johnson et al., 2009b). Finalement, il est nécessaire de prendre en compte la possibilité que ces interactions observées chez les abeilles domestiques aient des effets délétères également sur les pollinisateurs sauvages compte tenu de leur capacité de résilience réduite due à l'absence de socialité.

Annexes 1 – Communications affichées

1. 2-3 Février 2016 : Présentation d'un poster aux Journées de la Recherche Apicole (Paris, ITSAP)

« *Transmission du virus de la paralysie chronique (CBPV) entre abeilles, en conditions in vitro* »

2. 07-08-09 Septembre 2016 : Présentation d'un poster au congrès international EURBEE (Cluj-Napoca, Roumanie)

« *Metabolization of a neonicotinoid and interaction with the Chronic Bee Paralysis Virus in honeybees* »

3. 30-31 Mars 2017 : Présentation d'un poster aux Journées Francophones de Virologie (Paris, Institut Pasteur) et 08-09 Février 2017 : Présentation d'un poster aux Journées de la Recherche Apicole (Paris, ITSAP)

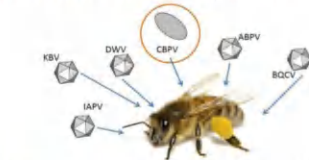
« *Expérimentations in situ : une approche complémentaire à l'évaluation des co-expositions entre un néonicotinoïde (thiamethoxam) et le virus des ailes déformées (DWV)* »

Transmission du virus de la paralysie chronique (CBPV) entre abeilles, en condition *in vitro*

M. Coulon^{1,2}, F. Schurr¹, N. Cougoule¹, A. Dalmon², Y. Le Conte², R. Thiéry¹, M. Ribière-Chabert¹, E. Dubois¹
¹ANSES, Laboratoire de Sophia-Antipolis, Les Templiers, 105, route des Chappes, CS 20111 06902 Sophia-Antipolis ; ²INRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, Domaine Saint-Paul, 84914 AVIGNON Cedex 9, France

Introduction

Les virus sont connus comme participant au déclin des abeilles.



Symptômes de la paralysie chronique :

- tremblements
- diarrhées
- abdomens enflés
- dépilation et/ou coloration noire

Pour étudier ces virus en condition *in vitro*, il est intéressant de développer une technique d'infection au plus proche de la réalité en ruche :

Question : Des abeilles saines confinées avec des abeilles malades développent-elles le CBPV de façon comparable aux abeilles ayant reçu une injection de virus ?

En effet, le CBPV peut être transmis de plusieurs façons (Bailey *et al.*, 1983 ; Ribière *et al.*, 2007) :

- Verticale
- Horizontale :
 - Par trophallaxie
 - Par **contact**

Matériel & méthodes

Mode opératoire de contamination :

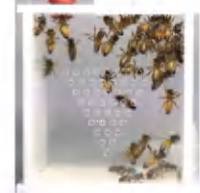
Les abeilles ont été réparties dans 24 cagettes selon les modalités suivantes, en contact ou non avec des abeilles infectées et à comparer avec un témoin injecté :



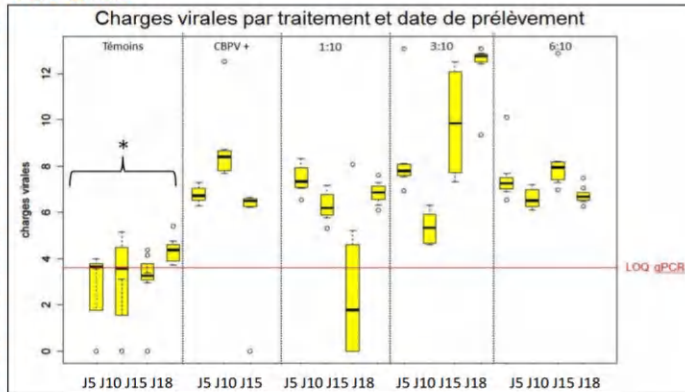
Le suivi a été réalisé à 5, 10, 15 et 18 jours après contact avec les abeilles infectées.

Analyse individuelle des abeilles : Les ARN viraux de 8 abeilles par modalité et date de prélèvement ont été purifiés, en utilisant le kit High Pure Viral RNA Kit (Roche). Les ADNc correspondants ont été obtenus avec le kit SuperScript II (Invitrogen), puis quantifiés en PCR quantitative TaqMan.

Analyses statistiques : ANOVA suivie d'un test HSD de Tukey (R)



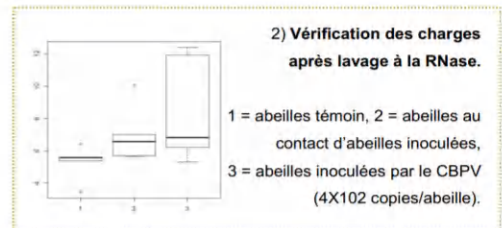
Résultats



Les charges sont représentées en log₁₀, et ont été obtenues individuellement par analyse moléculaire quantitative (qPCR).

1) **Représentation graphique des charges virales (log₁₀) par abeille et par traitement :**

T = abeilles témoin, V = abeilles inoculées par le CBPV, Abeilles au contact d'abeilles inoculées : A = 1 : 10, B = 3 : 10 et C = 6 : 10) et par date de prélèvement (J5, J10, J15, J18 après l'inoculation ou le début de la mise en présence).



2) **Vérification des charges après lavage à la RNase.**

1 = abeilles témoin, 2 = abeilles au contact d'abeilles inoculées, 3 = abeilles inoculées par le CBPV (4X10² copies/abeille).

Discussion

1) Les charges virales des abeilles ne présentent pas de différences significatives en fonction du nombre d'abeilles malades ajoutées à la cagette : l'efficacité de transmission du virus ne dépend pas du nombre d'abeilles malades. Les charges virales des abeilles infectées par injection ne sont pas non plus significativement différentes de celles infectées par mise en présence d'abeilles malades. Cette voie d'infection semble donc efficace. On observe que de faibles charges virales ont été détectées chez les abeilles du groupe témoin négatif. Cependant, ces très faibles charges virales (10¹ copies par abeille) sont stables dans le temps et restent significativement inférieures aux charges virales observées dans les abeilles des autres groupes (p<0.05)

2) Une vérification a été effectuée *a posteriori* afin de savoir si les virus quantifiés résultaient bien d'une répllication chez l'abeille et n'étaient pas simplement adsorbés à la cuticule à l'extérieur des abeilles testées : une quantification sur de nouvelles abeilles a été effectuée après lavage aux RNases. On observe une différence entre les médianes des trois groupes, et l'on peut en conclure que les abeilles en contact avec des malades développent effectivement le virus, puisque leurs charges sont supérieures à celles des témoins, mais pas autant que les abeilles inoculées avec le CBPV. Nous obtenons donc par contact des abeilles en dessous du seuil de développement des signes cliniques et mortalités (évalué à 10⁵ copies/abeille).

En conclusion, nous avons confirmé *in vitro* la transmission du CBPV d'abeilles malades infectées expérimentalement à abeilles saines, qui développent ensuite la maladie. Nous avons ainsi développé une méthode de transmission du virus de la paralysie chronique répétable et causant moins de stress qu'une injection directe du virus, mais permettant d'obtenir des abeilles infectées dans des conditions proche de la réalité en ruche.



Metabolization of a neonicotinoid and interaction with the Chronic Bee Paralysis Virus in honeybees



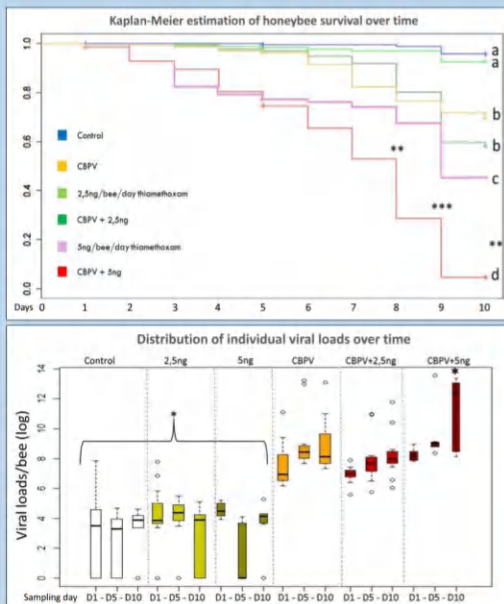
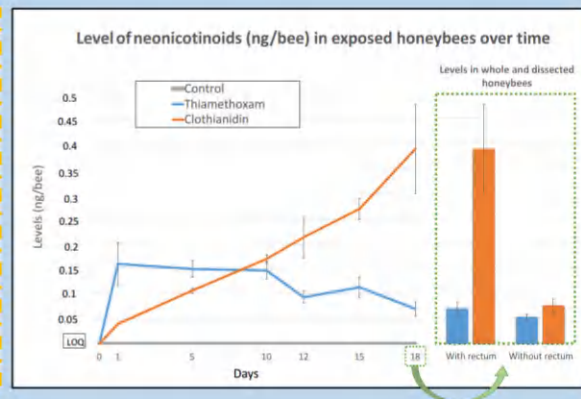
M. Coulon^{1,2}, F. Schurr¹, A.-C. Martel¹, N. Cougoule¹, A. Bégaud¹, P. Mangoni¹, A. Dalmon², C. Alaux², Y. Le Conte², R. Thiéry¹, M. Ribière-Chabert¹, E. Dubois¹
¹ANSES Sophia Antipolis - Unit of Honeybee Pathology - 105, route des Chappes - F06902 Sophia-Antipolis - France ; ²INRA PACA - UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc - F84914 Avignon - France
Contact : marianne.coulon@anses.fr

- Alarming honeybee colony losses are often reported around the world. If neonicotinoids, a family of insecticides used in agricultural production, are regularly blamed, it seems that alone they cannot explain these losses, but can be suspected to interact with others factors (e.g. pathogens).
- In this study, we describe the metabolization kinetics in the honeybees of one neonicotinoid (thiamethoxam) into its main metabolite (clothianidin). We then investigate the effects of a co-exposure to this insecticide and the Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV).



Metabolization of thiamethoxam into clothianidin

- Three replicates of 20 honeybees for each sampling day (420 bees in 21 cages) were chronically exposed to 0.25ng/bee/day of thiamethoxam via contaminated syrup. Survival of contaminated bees was monitored every day and was found not significantly different from the control group.
- Thiamethoxam and clothianidin were quantified in each replicate by LC-MS-MS [1]. Over time, honeybees metabolized thiamethoxam into clothianidin. Clothianidin seemed to accumulate in honeybees.
- At day 18, two groups of exposed honeybees were tested: one group of whole bees, the second group of dissected bees (without rectum). Clothianidin seemed to accumulate in the rectum. The engaged bees could not perform hygienic flights, and likely kept the neonicotinoid metabolite that should normally be excreted.



Co-exposure

- Honeybees were exposed during 10 days to: CBPV (by contact with virus-infected bees), two different thiamethoxam concentrations (2.5 and 5.0 ng/bee/day), or both. Bee survival was monitored every day.
- Survival was significantly impacted by co-exposure to the highest concentration of thiamethoxam and CBPV-infected bees. There was a synergistic effect on bee survival of the co-exposure to CBPV and 5 ng of thiamethoxam (χ^2 test, 1 degree of freedom) at day 8, 9 and 10.
- CBPV loads were quantified by real-time PCR [2] on individual bees at day 1, day 5 and day 10 for each experimental group (n=24). Two statistically different groups of viral loads were found: one clustering honeybees in contact with CBPV-infected bees, and the second one clustering honeybees without contact with sick bees. Only at day 10 was the viral load in the honeybees co-exposed to CBPV and the highest concentration of thiamethoxam significantly different from the other tested honeybees.

Take home message

Co-exposure to thiamethoxam and CBPV-infected bees had significant effect on CBPV loads in honeybees, but only at the highest neonicotinoid dose (5 ng/bee/day). Moreover, a synergistic effect was observed on the mortality of bees co-exposed to the highest dose of thiamethoxam and CBPV.

Further studies investigating potential changes at the immune and detoxification levels will help to better understand such interaction.

Funded by both :



Special thanks to Cyril Vidau and Jean-Luc Brunet for their suggestions and help



[1] Martel, et al., 2011, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 91(10), 978-988 ; [2] Blanchard et al., 2012, Journal of Virological Methods 180:26-31.

Expérimentations *in situ* : une approche complémentaire à l'évaluation des co-expositions entre un néonicotinoïde (thiamethoxam) et le virus des ailes déformées (DWV)

M. Coulon^{1,2}, D. Crauser¹, C. Alaux¹, Y. Le Conte¹, G. Di Prisco³, R. Thiéry², M. Ribière-Chabert², E. Dubois², A. Dalmon¹

¹INRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, Domaine Saint-Paul, 84914 Avignon, France; ²ANSES, Laboratoire de Sophia-Antipolis, 105, route des Chappes, CS 20111 06902 Sophia-Antipolis, France; ³Dipartimento di Agraria, Laboratorio di Entomologia E. Tremblay, Università degli Studi di Napoli Federico II, I-80055 Portici, Italie

Les recherches sur les interactions entre des virus et des pesticides chez l'abeille ont été presque exclusivement réalisées en laboratoire. Afin d'étudier ces interactions en conditions plus naturelles, nous avons mené deux expériences parallèles de co-exposition en ruche, sur le domaine de l'INRA d'Avignon: la première vise à suivre les traits d'histoire de vie d'abeilles infectées expérimentalement, l'évolution de leurs charges virales et la transcription du gène de la vitellogénine, au rôle important dans la régulation de l'âge et du comportement des abeilles, et la seconde à étudier l'effet du thiamethoxam sur les charges en DWV dans des colonies naturellement infectées.

Expérience « Compteurs »

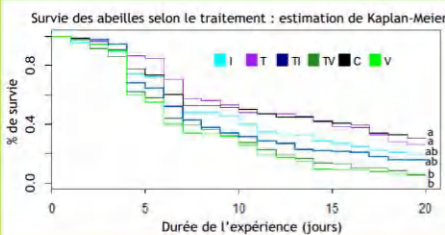
- Thiamethoxam : exposition aiguë, orale, individuelle : 0,25ng/abeille
- DWV : infection expérimentale : injection de 10⁴ copies DWV/abeille
- Abeilles émergentes marquées, exposées/infectées à 1 jour
- 6 conditions :
 1. Témoin (C)
 2. Exposition au thiamethoxam (T)
 3. Témoin d'injection (PBS)(I)
 4. Injection de DWV (V)
 5. Témoin d'injection + thiamethoxam (TI)
 6. Injection de DWV + thiamethoxam (TV)



Principe des compteurs optiques :
Enregistre en temps réel les entrées et sorties pour chacune des abeilles marquées. Suivi durant 20 jours.

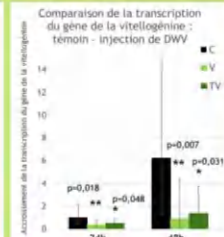
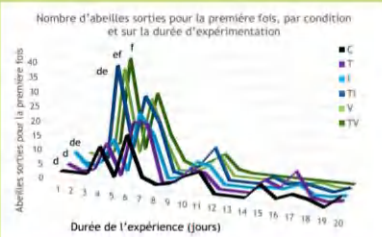
- RT-PCR quantitative à 24 et 48h pi, pour :
 - Suivre les charges virales en DWV
 - Quantifier des transcrits de la vitellogénine

Premiers résultats et discussion :



• Effet significatif de l'injection de virus sur la survie. Trois groupes se dessinent: sans injections (a), injection de PBS (ab) et injection de DWV (b) (test du log rank: a=b)

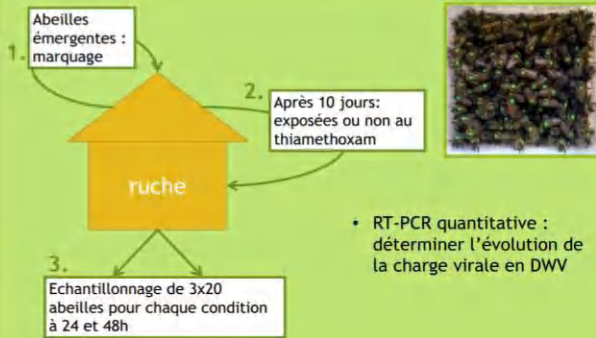
- Pas d'effet de l'interaction thiamethoxam/DWV sur la survie.



- Les abeilles ont commencé leur activité de vol (sortie >10min) significativement plus tôt pour les conditions avec injection de DWV (Test T3 de Dunnett; d≠e≠f). L'ajout de thiamethoxam ne modifie pas l'effet du virus.
- Première explication :
 - diminution significative de la transcription de la vitellogénine (LSD). La quantité de vitellogénine est liée aux changements de caste des abeilles; moins de vitellogénine = les abeilles deviennent butineuses plus tôt (Amdam *et al.*, 2005; Antonio *et al.*, 2008).

Expérience « Cohortes »

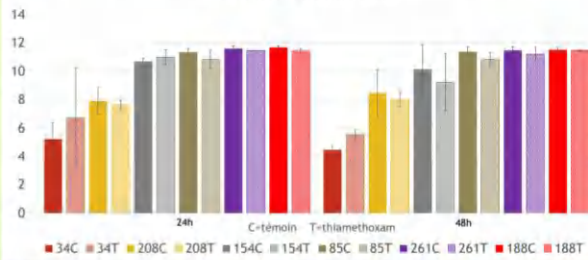
- Thiamethoxam : exposition aiguë, orale, collective : 1ng/abeille
- DWV : infection naturelle : 10 ruches suivant un gradient d'infection



- RT-PCR quantitative : déterminer l'évolution de la charge virale en DWV

Résultats et discussion :

Charges virales par abeille en DWV (log10), pour chaque ruche et temps de prélèvement, en fonction du traitement.



- Pas d'effet du thiamethoxam sur la charge en DWV des abeilles en ruche (test de Wilcoxon) dans nos conditions expérimentales; contrairement à ce qui avait été observé en laboratoire par Di Prisco *et al.* en 2013 avec la clothianidine (métabolite du thiamethoxam).

- Hypothèses :
 - Forte contamination naturelle déjà présente dans les ruches testées, qui ne permet pas d'observer de variations plus fines.
 - Action de l'immunité sociale apportée par la colonie.
 - Doses de thiamethoxam trop faibles = détoxification rapide
 - Effectifs trop petits



Ces essais en conditions « terrain » montrent que ce qui est obtenu en laboratoire peut ne pas être directement transposable aux effets obtenus dans les colonies. Dans le cadre d'une étude de co-exposition pesticide/virus, compléter les études en laboratoire par des expériences sur des colonies dans des ruches, avec des doses environnementales pertinentes (de 0,20 à 13ng/g de nectar (Botias *et al.*, 2015)) permet de valider les résultats, de les compléter, et peut-être, de mesurer des effets inobservables en cage, tels que des effets sur le comportement. Une analyse approfondie des résultats de l'expérience « Compteurs », comprenant une quantification de la transcription de certains gènes de l'immunité ou liés à la détoxification des pesticides, permettra peut-être d'obtenir de nouveaux éléments à comparer avec de précédentes expériences en laboratoire.

Annexe 2 – Curriculum vitae

Marianne COULON

27 ans
48 Rue Proudhon
63000 Clermont-Ferrand

Doctorante en biologie



06-98-30-77-62

Mail : coulonmarianne@gmail.com
Skype : marianne.coulon@outlook.fr

Expériences professionnelles

➤ Décembre 2014 – Décembre 2017 : Doctorat en biologie

Cofinancement ANSES/INRA

« *INTERBEE : rôle des interactions virus/pesticides dans le déclin des abeilles* »

ANSES Unité Pathologie de l'abeille, Laboratoire de Sophia-Antipolis
INRA Unité Abeilles et Environnement, INRA PACA

➤ Avril 2014 – Novembre 2014 (mi-temps) : Ingénieur d'études en Microbiologie

Laboratoire de Physique Corpusculaire (LPC), Université Blaise Pascal (UMR 6533), Aubière (63)

Projet IRIS : Comparaison de l'évolution d'*E.coli* en deux milieux radiatifs différents : milieu radiatif naturel au LPC (63) et protégé au Laboratoire Souterrain de Modane (73)

➤ Janvier 2013 – Juillet 2013 (6 mois) Stage de recherche de M2

au Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement de l'Université Blaise Pascal (UMR 6023) à Aubière (63) Responsables : David BIRON et Téléphore SIME-NGANDO

« Analyse spatio-temporelle des virus associés aux colonies d'abeilles »

➤ Mai 2012 – Août 2012 Stage de recherche de M1

à l'Institute of Evolutionary Biology de l'Université d'Edimbourg (UK) (4 mois)

Responsables : Graham STONE et Thomas G. GODFREY :

« Ecology and enrichment of urban pollinator communities: comparison of the value of three commercial mixes to pollinators »

- Biologie moléculaire
- Elevage d'insectes en laboratoire
- Apiculture
- Communications en congrès internationaux
- Rédaction d'articles scientifiques
- Collaborations internationales (EIR-A Agreenium)

- Microbiologie
- Développement, commande de matériel et installation d'un laboratoire de microbiologie en espace confiné (Tunnel du Fréjus)
- Coordination entre deux laboratoires

- Biologie moléculaire
- Cytométrie en flux

- Quadrats, transects
- Capture d'insectes, récolte de nectar et pollen sur le terrain
- Identification d'insectes (clés)

Formation

- 2011-2013 Master Biologie et Environnement à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand (63)
 - Master 2ème année spécialité Microbiologie : Génome, Ecologie et Biotechnologies (MGEB) section recherche, mention assez bien (AB) (6ème /22) ; Ecologie et physiologie microbiennes, étude des microorganismes pathogènes, biologie cellulaire et moléculaire
 - Master 1ère année spécialité Fonctionnement et Restauration des Milieux Aquatiques Continentaux (FREMAG), mention AB (5ème /77) ; Ecophysiologie, biologie et génétique des populations, écotoxicologie, biostatistiques
- 2008-2011 Licence Biologie Générale à l'Université Joseph Fourier de Grenoble (38), mention AB
- 2007-2008 Séjour d'un an en Finlande (Rotary Youth Exchange Program)
- 2007 Baccalauréat Scientifique spécialité SVT au Lycée Alain Borne de Montélimar (26), mention AB

1

Publications

- [COULON, M. et al. Metabolisation of thiamethoxam \(a neonicotinoid pesticide\) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees . *Pesticide Biochemistry and Physiology* \(accepté, en cours de publication\).](#)
- [DALMON, A., DESBIEZ, C., COULON, M., et al. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus \(DWV\). *Scientific Reports*, 2017, vol. 7.](#)
- [Biron, D. G., Bonhomme, L., Coulon, M., & Øverli, Ø. \(2015\). Microbiomes, plausible players or not in alteration of host behavior. *Roles and mechanisms of parasitism in aquatic microbial communities*, 139.](#)

Compétences

- **Langues**
 - Anglais niveau C1 (Test of English for International Communication (TOEIC) 2013, score 990)
 - Espagnol niveau B1,
 - Finnois niveau A1
- **Informatique**
 - Suite Microsoft Office
 - Logiciels de statistiques : SPSS ; R;
 - Adobe Photoshop
- **Techniques**
 - Biologie moléculaire (Purifications virales, extraction d'ARN totaux et viraux, RT-PCR, RT-PCR quantitative (relative et absolue), électrophorèses sur gel d'agarose)
 - Microbiologie (clonage, culture, fitness assays)
 - Cytométrie en flux
 - Elevage d'insectes en laboratoire
 - Apiculture
 - Ecologie (capture et identification d'insectes, quadrats)

Communications

- 30-31 Mars 2017 : Présentation d'un poster aux Journées Francophones de Virologie (Paris, Institut Pasteur)
« Expérimentations in situ : une approche complémentaire à l'évaluation des co-expositions entre un néonicotinoïde (thiamethoxam) et le virus des ailes déformées (DWV) »
- 08-09 Février 2017 : Présentation d'un poster aux Journées de la Recherche Apicole (Paris, ITSAP)
« Expérimentations in situ : une approche complémentaire à l'évaluation des co-expositions entre un néonicotinoïde (thiamethoxam) et le virus des ailes déformées (DWV) »
- 07-08-09 Septembre 2016 : Présentation d'un poster au congrès EURBEE (Cluj-Napoca, Roumanie)
« Metabolization of a neonicotinoid and interaction with the Chronic Bee Paralysis Virus in honeybees »
- 24 au 28 Juillet 2016 : Communication Orale au congrès international de la Society of Insect Pathology (Tours, France)
« In-vitro transmission of the Chronic Bee Paralysis Virus and co-exposure with a neonicotinoid in the honeybee »
- 24-25 Mars 2016 : Communication Orale aux Journées Francophones de Virologie (Paris, Institut Pasteur)
« Co-exposition virus/pesticide : effet de l'interaction CBPV-Thiaméthoxam sur les charges virales et la mortalité *in vitro* »
- 2-3 Février 2016 : Communication Orale aux Journées de la Recherche Apicole (Paris, ITSAP)
« Co-exposition virus/pesticide : effet de l'interaction CBPV-Thiaméthoxam sur les charges virales et la mortalité *in vitro* »

Centres d'intérêts

- Naturaliste passionnée (zoologie ,ostéologie des mammifères, botanique, géologie)
- Dessin (BD, aquarelle) , guitare et chant dans un groupe de rock pendant 5 ans
- Equitation (Galop 4)

Bibliographie

- Agaisse, H., Perrimon, N., Agaisse, H., Perrimon, N., 2004. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol. Rev.* 198, 72–82. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x
- Aizen, M.A., Harder, L.D., 2009. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Curr. Biol.* 19, 915–918. doi:10.1016/j.cub.2009.03.071
- Akaike, T., 2001. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med. Virol.* 11, 87–101. doi:10.1002/rmv.303
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010a. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x
- Alaux, C., Crauser, D., Pioz, M., Saulnier, C., Conte, Y. Le, 2014. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. doi:10.1242/jeb.105783
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010b. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6, 562–565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986
- Alburaki, M., Boutin, S., Mercier, P.-L., Loublier, Y., Chagnon, M., Derome, N., 2015. Neonicotinoid-Coated *Zea mays* Seeds Indirectly Affect Honeybee Performance and Pathogen Susceptibility in Field Trials. *PLoS One* 10, e0125790. doi:10.1371/journal.pone.0125790
- Aliouane, Y., Assani, H., Ary, V.I.G., Rmengaud, C.A.A., Ambin, M.I.L., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides : effects on behavior 28, 113–122.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., 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. doi:10.1897/08-110.1
- Amdam, G.V., Omholt, S.W., 2002. The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *J. theor. Biol.* 216, 209–228. doi:10.1006
- Amdam, G. V., 2011. Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* 10, 18–27. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00647.x

- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., 2004a. Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera : Apidae) Infested with the Mite Varroa destructor (Acari : Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering ? doi:10.1603/0022-0493(2004)097
- Amdam, G. V., Simões, Z.L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B., Omholt, S.W., 2004b. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39, 767–773. doi:10.1016/j.exger.2004.02.010
- Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2015. Four categories of viral infection describe the health status of honey bee colonies. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0140272
- Amiri, E., Meixner, M.D., Kryger, P., 2016. Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. *Sci. Rep.* 6, 33065. doi:10.1038/srep33065
- Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott, B.M., DeGrandi-Hoffman, G., 2011. An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* 58, 431–444. doi:10.1007/s00040-011-0194-6
- ANSES, 2015. Co-exposition des abeilles aux facteurs de stress Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective 268.
- ANSES, 2012. Avis de l' Agence nationale de sécurité sanitaire de l' alimentation, de l' environnement et du travail, Maisons-Alfort. doi:2011-SA-0133
- 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. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Aston, D., Bucknall, S., 2009. *Plants and Honey Bees : An Introduction to Their Relationships*. Northern Bee Books.
- Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N., Bernardinelli, I., 2008. *Virology and the Honey Bee*, European C. ed. European Commission publications office.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Viguès, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 1–7. doi:10.1038/srep00326

- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N., 2014. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS One* 9, e91686. doi:10.1371/journal.pone.0091686
- Bailey, B.Y.L., Ball, B. V, Perry, J.N., 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee 13–20.
- Bailey, L., Fernando, E., 1972. Effects of sacbrood virus on adult honeybees. *Ann. Appl. Biol.* 72, 27–35. doi:10.1111/j.1744-7348.1972.tb01268.x
- Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D., 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21, 390–395. doi:10.1016/0042-6822(63)90200-9
- Baracchi, D., Fadda, A., Turillazzi, S., 2012. Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. *J. Insect Physiol.* 58, 1589–1596. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.09.014
- Barganska, Z., Slebioda, M., Namiesnik, J., 2013. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland 31, 196–201. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.049
- Behrends, A., Scheiner, R., 2010. Learning at old age: a study on winter bees. *Front. Behav. Neurosci.* 4, 1–11. doi:10.3389/fnbeh.2010.00015
- Benaets, K., Van Geystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., de Graaf, D.C., Schoofs, L., Larmuseau, M.H.D., Brettell, L.E., Martin, S.J., Wenseleers, T., 2017. Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162149. doi:10.1098/rspb.2016.2149
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S., 2002. Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* 83, 3139–3146.
- Benzidane, Y., Touinsi, S., Motte, E., Jadas-Hécart, A., Communal, P.Y., Leduc, L., Thany, S.H., 2010. Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Manag. Sci.* 66, 1351–1359. doi:10.1002/ps.2022
- Berenbaum, M.R., Johnson, R.M., 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 51–58. doi:10.1016/j.cois.2015.03.005
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Nowotny, N., 2006. Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2414–2420. doi:10.1128/AEM.72.4.2414

- Bertin, R.I., The, S., Society, B., 2008. Plant Phenology And Distribution In Relation To Recent Climate Change Plant phenology and distribution in relation to recent climate change 135, 126–146.
- Blacquièrè, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A.M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 973–992. doi:10.1007/s10646-012-0863-x
- Blacquièrè, T., van der Steen, J.J.M., 2017. Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? *Pest Manag. Sci.* doi:10.1002/ps.4583
- Blair, C.D., Olson, K.E., 2015. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses* 7, 820–843. doi:10.3390/v7020820
- Blanchard, P., Regnault, J., Schurr, F., Dubois, E., Ribière, M., 2012. Intra-laboratory validation of chronic bee paralysis virus quantitation using an accredited standardised real-time quantitative RT-PCR method. *J. Virol. Methods* 180, 26–31. doi:10.1016/j.jviromet.2011.12.005
- Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J. Virol. Methods* 141, 7–13. doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.021
- Bland, J.M., Altman, D.G., 2004. The logrank test. *BMJ* 328, 1073. doi:10.1136/bmj.328.7447.1073
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., 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. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.12.011
- Boncrisiani, H.F., Evans, J.D., Chen, Y.P., Pettis, J., Murphy, C., Lopez, D.L., Simone-Finstrom, M., Strand, M., Tarpay, D.R., Rueppell, O., 2013. In Vitro Infection of Pupae with Israeli Acute Paralysis Virus Suggests Disturbance of Transcriptional Homeostasis in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8. doi:e7342910.1371/journal.pone.0073429
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. a. D., Noome, D. a., Simon-Delso, N., Tapparo, a., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67. doi:10.1007/s11356-014-3332-7
- Bordier, C., Pioz, M., Crauser, D., Le Conte, Y., Alaux, C., 2016. Should I stay or should I

go : honeybee drifting behaviour as a function of parasitism. *Apidologie*.

- Bordier, C., Suchail, S., Pioz, M., Devaud, J.M., Collet, C., Charreton, M., Le Conte, Y., Alaux, C., 2017. Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism. *J. Insect Physiol.* 98, 47–54. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.013
- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E.M., Goulson, D., 2015. Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ. Sci. Technol.* 151006133035001. doi:10.1021/acs.est.5b03459
- Boucias, D.G., 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 49, 103–144.
- Bowen-Walker, P., Martin, S., Gunn, A., 1999. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera* L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 101–106. doi:10.1006/jipa.1998.4807
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.01.001
- Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Kozák, L., Scheper, J., Biesmeijer, J.C., Kleijn, D., Gyldenkerne, S., Moretti, M., Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Stout, J.C., Pärtel, M., Zobel, M., Potts, S.G., 2014. Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0082996
- Bruneau, E., Barbançon, J.M., Bonnafé, P., Domerego, R., Fert, G., Le Conte, Y., Ratia, G., Reeb, C., Vaissière, B., 2006. Le traité Rustica de l'apiculture, in: *Le Traité Rustica de L'apiculture*. Rustica éditions, pp. 40–48.
- Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F., Flenniken, M.L., 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2, 1–12. doi:10.1016/j.cois.2015.04.016
- Brutscher, L.M., McMenamin, A.J., Flenniken, M.L., 2016. The Buzz about Honey Bee Viruses. *PLoS Pathog.* 12, 1–7. doi:10.1371/journal.ppat.1005757
- Bryden, J., Gill, R.J., Mitton, R.A.A., Raine, N.E., Jansen, V.A.A., 2013. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecol. Lett.* 16, 1463–1469. doi:10.1111/ele.12188
- Bull, J.C., Ryabov, E. V., Prince, G., Mead, A., Zhang, C., Baxter, L. a., Pell, J.K., Osborne, J.L., Chandler, D., 2012. A Strong Immune Response in Young Adult Honeybees Masks

Their Increased Susceptibility to Infection Compared to Older Bees. *PLoS Pathog.* 8, e1003083. doi:10.1371/journal.ppat.1003083

Burden, J.P., Griffiths, C.M., Cory, J.S., Smith, P., Sait, S.M., 2002. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Mol. Ecol.* 11, 547–555. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01439.x

Burden, J.P., Nixon, C.P., Hodgkinson, A.E., Possee, R.D., Sait, S.M., King, L.A., Hails, R.S., 2003. Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecol. Lett.* 6, 524–531. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00459.x

Calabrese, E.J., Canada, A.T., 1989. Catalase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacol. Ther.* 44, 297–307.

Carreck, N.L., Ball, B. V, Martin, S., 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 49, 93–94. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.13

Casida, J.E., 2011. Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2923–2931. doi:10.1021/jf102438c

Catae, A.F., Roat, T.C., De Oliveira, R.A., Ferreira Nocelli, R.C., Malaspina, O., 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77, 274–281. doi:10.1002/jemt.22339

Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.-P., Ribière, M., 2008. Detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res.* 133, 280–284. doi:10.1016/j.virusres.2007.12.011

Celli, G., Maccagnani, B., 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bull. Insectology* 56, 137–139.

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol.* 58, 1090–1095. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.04.016

Chauzat, M.-P., Faucon, J.-P., 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* l.) in France. *Pest Manag. Sci.* 63, 1100–1106. doi:10.1002/ps.1451

Chauzat, M.-P., Faucon, J.-P., Martel, A.-C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A

- survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99, 253–262. doi:10.1603/0022-0493-99.2.253
- Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.-P., 2011. AN ASSESSMENT OF HONEYBEE COLONY MATRICES, *APIS MELLIFERA* (HYMENOPTERA APIDAE) TO MONITOR PESTICIDE PRESENCE IN CONTINENTAL FRANCE. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 103–111. doi:10.1002/etc.361
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H.T., Evans, J., Feldlaufer, M., 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87, 84–93. doi:10.1016/j.jip.2004.07.005
- Chen, Y.P., Siede, R., 2007. Honey Bee Viruses, in: *Advances in Virus Research*. pp. 33–80. doi:10.1016/S0065-3527(07)70002-7
- Chevin, A., Schurr, F., Blanchard, P., Thiery, R., Ribiere, M., 2012. Experimental infection of the honeybee (*Apis mellifera* L.) with the chronic bee paralysis virus (CBPV): infectivity of naked CBPV RNAs. *Virus Res.* 167, 173–178. doi:10.1016/j.virusres.2012.04.012
- Christen, V., Fent, K., 2017. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environ. Pollut.* 226, 48–59. doi:10.1016/j.envpol.2017.04.003
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M. a., Berenbaum, M.R., Feyereisen, R., Oakeshott, J.G., 2006. A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.* 15, 615–636. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x
- Clément, H., Le Conte, Y., Barbançon, J.-M., Vaissière, B.E., 2011. *Le traité Rustica de l'apiculture*. Rustica éditions.
- Colla, S.R., Otterstatter, M.C., Gegear, R.J., Thomson, J.D., 2006. Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biol. Conserv.* 129, 461–467. doi:10.1016/j.biocon.2005.11.013
- Commission des Essais Biologiques, Association Française de protection des plantes, 2014. *Méthode d'évaluation des effets des préparations phytopharmaceutiques sur l'abeille domestique Apis Mellifera L.*
- Corby-Harris, V., Habel, K.E., Ali, F.G., Promislow, D.E.L., 2007. Alternative measures of response to *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 20, 526–533. doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01267.x

- Cornman, R.S., Tarpay, D.R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0043562
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.C., Cougoule, N., Bégaud, A., Mangoni, P., Dalmon, A., Alaux, C., Le Conte, Y., Thiéry, R., Ribière-Chabert, M., Dubois, E., n.d. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid insecticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. ?
- Cox-foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N. a, Quan, P., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., 2007. A Metagenomic Survey of Collapse Disorder. *October* 318, 283–287. doi:10.1126/science.1146498
- Cox, D.R., 1972. Regression models and life tables. *J. R. Stat. Soc.* 34, 187–220.
- Cutler, G.C., Rix, R.R., 2015. Can poisons stimulate bees? Appreciating the potential of hormesis in bee-pesticide research. *Pest Manag. Sci.* doi:10.1002/ps.4042
- Daborn, P.J., 2002. A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*. *Science* (80-.). 297, 2253–2256. doi:10.1126/science.1074170
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012a. Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987. doi:10.1128/AEM.06537-11
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012b. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0032151
- Dainat, B., VanEngelsdorp, D., Neumann, P., 2012c. Colony collapse disorder in Europe. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 123–125. doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., Moury, B., 2017. Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Nat. Publ. Gr.* 1–12. doi:10.1038/srep41045
- de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B. V, Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D.C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., van der Steen, J.J.M., 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, 1–56. doi:10.3896/IBRA.1.52.4.22
- de Miranda, J.R., Fries, I., 2008. Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Invertebr. Pathol.* 98, 184–189. doi:10.1016/j.jip.2008.02.004

- de Miranda, J.R., Genersch, E., 2010. Deformed wing virus. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S48–S61. doi:10.1016/j.jip.2009.06.012
- Degrandi-hoffman, G., Chen, Y., Simonds, R., 2013. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in 71–89.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Simonds, R., 2013. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titers in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 4, 71–89. doi:10.3390/insects4010071
- Derveau, S., 2015. Interaction of diet , access to food , and age on the susceptibility of the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) to neonicotinoid pesticides. Newcastle University.
- Desai, S.D., Currie, R.W., 2016. Effects of Wintering Environment and Parasite – Pathogen Interactions on Honey Bee Colony Loss in North Temperate Regions 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0159615
- Desai, S.D., Eu, Y.J., Whyard, S., Currie, R.W., 2012. Reduction in deformed wing virus infection in larval and adult honey bees (*Apis mellifera* L.) by double-stranded RNA ingestion. *Insect Mol. Biol.* 21, 446–455. doi:10.1111/j.1365-2583.2012.01150.x
- Desbiez, C., Chandeysson, C., Lecoq, H., Moury, B., 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *J. Virol. Methods* 183, 94–7. doi:10.1016/j.jviromet.2012.03.035
- Desbiez, C., Lecoq, H., 1997. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Pathol.* 46, 809–829. doi:10.1046/j.1365-3059.1997.d01-87.x
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091440
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.L., Alaux, C., 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS One* 8, 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0072016
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., Pennacchio, F., 2016. A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3203–3208. doi:10.1073/pnas.1523515113
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G.,

- Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18466–18471. doi:10.1073/pnas.1314923110
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J.R., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J., 2015a. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.* 17, 969–983. doi:10.1111/1462-2920.12426
- Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L., Paxton, R.J., 2015b. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 31–34. doi:10.1016/j.jip.2014.10.007
- Doublet, V., Poeschl, Y., Gogol-Döring, A., Alaux, C., Annoscia, D., Aurori, C., Barribeau, S.M., Bedoya-Reina, O.C., Brown, M.J.F., Bull, J.C., Flenniken, M.L., Galbraith, D.A., Genersch, E., Gisder, S., Grosse, I., Holt, H.L., Hultmark, D., Lattorff, H.M.G., Le Conte, Y., Manfredini, F., McMahon, D.P., Moritz, R.F.A., Nazzi, F., Niño, E.L., Nowick, K., van Rij, R.P., Paxton, R.J., Grozinger, C.M., 2017. Erratum to: Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* 18, 256. doi:10.1186/s12864-017-3624-7
- Downey, D.L., Higo, T.T., Winston, M.L., 2000. Single and dual parasitic mite infestations on the honey bee, *Apis mellifera* L. 47, 171–176.
- du Rand, E.E., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., Apostolides, Z., 2017. The metabolic fate of nectar nicotine in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* 98, 14–22. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.10.017
- Dupressoir, A., Laviaille, C., Heidmann, T., 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured syncytins in placentation. *Placenta* 33, 663–671. doi:10.1016/j.placenta.2012.05.005
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0037017
- Dussaubat, C., Costagliola, G., Conte, Y. Le, 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis ...* *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51. doi:10.1016/j.jip.2013.01.002
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Tchamitchian, S., Bonnet, M., Cousin, M., Kretzschmar, A., Brunet, J.-L., Le Conte, Y., 2016. Combined neonicotinoid pesticide

- and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Sci. Rep.* 6, 31430. doi:10.1038/srep31430
- Efron, B., 1988. Logistic regression, survival analysis, and the Kaplan-Meier curve.
- Efsa, 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA J.* 11, 1–68. doi:10.2903/j.efsa.2013.3067.
- Erban, T., Jedelsky, P.L., Titera, D., 2013. Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie* 44, 404–418. doi:10.1007/s13592-012-0190-5
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 15, 645–656. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72. doi:10.1016/j.jip.2009.06.019
- Evison, S.E.F., Roberts, K.E., Laurenson, L., Pietravalle, S., Hui, J., Biesmeijer, J.C., Smith, J.E., Budge, G., Hughes, W.O.H., 2012. Pervasiveness of parasites in pollinators. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0030641
- FAO, Hamilton, D., n.d. Thiamethoxam Evaluation.
- Fievet, J., Tentcheva, D., Gauthier, L., de Miranda, J., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2006. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virol. J.* 3, 16. doi:10.1186/1743-422X-3-16
- Fitter, A.H., 2002. Rapid Changes in Flowering Time in British Plants. *Science* (80-.). 296, 1689–1691. doi:10.1126/science.1071617
- Flenniken, M.L., Andino, R., 2013. Non-Specific dsRNA-Mediated Antiviral Response in the Honey Bee. *PLoS One* 8, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0077263
- Forgách, P., Bakonyi, T., Tapasztó, Z., Nowotny, N., Rusvai, M., 2008. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 235–238. doi:10.1016/j.jip.2007.11.002
- Forsgren, E., Fries, I., de Miranda, J.R., 2012. Adult honey bees (*Apis mellifera*) with deformed wings discovered in confirmed varroa-free colonies. *J. Apic. Res.* 51, 136–138. doi:10.3896/IBRA.1.51.1.17

- Forterre, P., 2010. Defining Life: The Virus Viewpoint. *Orig. Life Evol. Biosph.* 40, 151–160. doi:10.1007/s11084-010-9194-1
- Fourrier, J., Petit, J., Fortini, D., Aupinel, P., Morhan, C., Grateau, S., Henry, M., Decourtye, A., 2014. A methodology to assess the effects of plant protection product on the homing flight of honeybee foragers.
- Fourrier, J., Ruger, C., Devillers, J., Aupinel, P., Gauthier, M., Decourtye, A., 2009. Sublethal effects of thiamethoxam on the ability of honeybees to orientate in a complex maze. *Proc. Apimondia Congr.* 69280.
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS One* 8, e57540. doi:10.1371/journal.pone.0057540
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 34, 389–397. doi:10.1051/apido:2003032
- Fürst, M. a, McMahon, D.P., Osborne, J.L., Paxton, R.J., Brown, M.J.F., 2014. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 506, 364–6. doi:10.1038/nature12977
- Gal-On, A., Meiri, E., Huet, H., Hua, W.J., Raccach, B., Gaba, V., 1995. Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. *J. Gen. Virol.* 76, 3223–3227. doi:10.1099/0022-1317-76-12-3223
- Galbraith, D. a, Yang, X., Niño, E.L., Yi, S., Grozinger, C., 2015. Parallel Epigenomic and Transcriptomic Responses to Viral Infection in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLOS Pathog.* 11, e1004713. doi:10.1371/journal.ppat.1004713
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821. doi:10.1016/j.ecolecon.2008.06.014
- Garibaldi, L.A., Carvalheiro, L.G., Vaissiere, B.E., Gemmill-Herren, B., Hipolito, J., Freitas, B.M., Ngo, H.T., Azzu, N., Saez, A., Astrom, J., An, J., Blochtein, B., Buchori, D., Garcia, F.J.C., Oliveira da Silva, F., Devkota, K., Ribeiro, M. d. F., Freitas, L., Gaglianone, M.C., Goss, M., Irshad, M., Kasina, M., Filho, A.J.S.P., Kiill, L.H.P., Kwapong, P., Parra, G.N., Pires, C., Pires, V., Rawal, R.S., Rizali, A., Saraiva, A.M., Veldtman, R., Viana, B.F., Witter, S., Zhang, H., 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science* (80-.). 351, 388–391. doi:10.1126/science.aac7287
- Garnery, L., Franck, P., Baudry, E., Vautrin, D., Cornuet, J.-M., Solignac, M., 1998. Genetic

- diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* 30, S31. doi:10.1186/1297-9686-30-S1-S31
- Garrido-Bailon, E., Martin-Hernandez, R., Bernal, J., Bernal, J.L., Martinez-Salvador, A., Barrios, L., Meana, A., Higes, M., 2010. Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish J. Agric. Res.* 8, 658–661.
- Genersch, E., Aubert, M., 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res.* 41, 54. doi:10.1051/vetres/2010027
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buechler, R., Berg, S., Ritter, W., Muehlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332–352. doi:10.1051/apido/2010014
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I., De Miranda, J.R., 2006. Detection of Deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 61–63. doi:10.1016/j.jip.2005.10.002
- Gherman, B.I., Denner, A., Bobiș, O., Dezmirean, D.S., Mărghitaș, L.A., Schlüns, H., Moritz, R.F.A., Erler, S., 2014. Pathogen-associated self-medication behavior in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 1777–1784. doi:10.1007/s00265-014-1786-8
- Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E., 2009. Deformed wing virus: Replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 90, 463–467. doi:10.1099/vir.0.005579-0
- Gisder, S., Genersch, E., 2017. Viruses of commercialized insect pollinators. *J. Invertebr. Pathol.* 147, 51–59. doi:10.1016/j.jip.2016.07.010
- Gisder, S., Genersch, E., 2015. Special issue: Honey bee viruses. *Viruses* 7, 5603–5608. doi:10.3390/v7102885
- González-Varo, J.P., Biesmeijer, J.C., Bommarco, R., Potts, S.G., Schweiger, O., Smith, H.G., 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. doi:10.1016/j.tree.2013.05.008
- Gordo, O., Sanz, J.J., 2006. Temporal trends in phenology of the honey bee *Apis mellifera* (L.) and the small white *Pieris rapae* (L.) in the Iberian Peninsula (1952-2004). *Ecol. Entomol.* 31, 261–268. doi:10.1111/j.1365-2311.2006.00787.x
- Goulson, D., Nicholls, E., 2016. The canary in the coalmine; bee declines as an indicator of environmental health. *Sci. Prog.* 99, 312–326.

doi:10.3184/003685016X14685000479908

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *SciencExpress* 1–16. doi:10.1126/science.1255957

Graystock, P., Meeus, I., Smagghe, G., Goulson, D., Hughes, W.O.H., 2016. The effects of single and mixed infections of *Apicystis bombi* and deformed wing virus in *Bombus terrestris*. *Parasitology* 143, 358–365. doi:10.1017/S0031182015001614

Grillone, G., Laurino, D., Manino, A., Porporato, M., 2017. Toxicity of thiametoxam on in vitro reared honey bee brood. *Apidologie*. doi:10.1007/s13592-017-0506-6

Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G. V, Barchuk, A.R., Simo, L.P., 2005. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect 579, 4961–4965. doi:10.1016/j.febslet.2005.07.085

Gupta, S., Gajbhiye, V.T., Kalpana, Agnihotri, N.P., 2002. Leaching behavior of imidacloprid formulations in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 502–8. doi:10.1007/s00128-001-0283-8

Guyader, S., Giblot-Ducray, D., 2004. L'évolution des virus à ARN: rôles de la sélection et de la dériv génétique. *Virologie* 8, 187–198.

Haith, D.A., 2010. Ecological Risk Assessment of Pesticide Runoff from Grass Surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6496–6502. doi:10.1021/es101636y

Harbo, J.R., Harris, J.W., 2005. Suppressed mite reproduction explained by the behaviour of adult bees. *J. Apic. Res.* 44, 21–23. doi:10.1080/00218839.2005.11101141

Hardstone, M.C., Scott, J.G., 2010. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag. Sci.* 66, 1171–1180. doi:10.1002/ps.2001

Hassanein, M.H., 1953. The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honeybee. *Ann. Appl. Biol.* 40, 418–423. doi:10.1111/j.1744-7348.1953.tb01093.x

Haut conseil des biotechnologies, 2013. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés.

Henry, M., Becher, M.A., Osborne, J.L., Kennedy, P.J., Aupinel, P., Bretagnolle, V., Brun, F., Grimm, V., Horn, J., Requier, F., 2016. Predictive systems models can help elucidate bee declines driven by multiple combined stressors. *Apidologie* 48, 328–339.

doi:10.1007/s13592-016-0476-0

- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* (80-.). 337, 1453–1453. doi:10.1126/science.1224930
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x
- 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. doi:10.1016/j.jip.2007.06.002
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1, 110–113. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x
- Highfield, a. C., El Nagar, a., Mackinder, L.C.M., Noel, L.M.-L.J., Hall, M.J., Martin, S.J., Schroeder, D.C., 2009. Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7212–7220. doi:10.1128/AEM.02227-09
- Hoffman, C.S., Winston, F., 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267–272. doi:10.1016/0378-1119(87)90131-4
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Hoppe, P.P., Safer, A., Amaral-Rogers, V., Bonmatin, J.-M., Goulson, D., Menzel, R., Baer, B., 2015. Effects of a neonicotinoid pesticide on honey bee colonies: a response to the field study by Pilling et al. (2013). *Environ. Sci. Eur.* 27, 28. doi:10.1186/s12302-015-0060-7
- Huang, Z., 2012. Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terr. Arthropod Rev.* 5, 175–189. doi:10.1163/187498312X639568
- 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. doi:10.1371/journal.ppat.1001160
- Ibrahim, A., Spivak, M., 2006. The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie* 37, 31–40. doi:10.1051/apido:2005052
- Iqbal, J., Mueller, U., 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 1517–1521. doi:10.1098/rspb.2007.0022
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* 23, 371–378. doi:10.1016/j.cropro.2003.08.018
- Jacques, A., Laurent, M., Ribière-Chabert, M., Saussac, M., Bougeard, S., Budge, G.E., Hendriks, P., Chauzat, M.-P., 2017. A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS One* 12, e0172591. doi:10.1371/journal.pone.0172591
- James, R.R., Xu, J., 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 175–182. doi:10.1016/j.jip.2011.12.005
- Jefferson, J.M., Dolstad, H. a., Sivalingam, M.D., Snow, J.W., 2013. Barrier Immune Effectors Are Maintained during Transition from Nurse to Forager in the Honey Bee. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0054097
- Johansen, C.A., 1977. Pesticides and pollinators. *Annu. Rev. Entomol.* 22, 177–192. doi:10.1146/annurev.en.22.010177.001141
- Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8. doi:e5409210.1371/journal.pone.0054092
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C. a., Frazier, M., 2010. Review article Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41, 312–331. doi:10.1051/apido/2010018
- Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R., 2009a. Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 102, 474–479. doi:10.1603/029.102.0202
- Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R., 2009b. Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 102, 474–479.

doi:10.1603/029.102.0202

Kessler, S.C., Tiedeken, E.J., Simcock, K.L., Derveau, S., Mitchell, J., Softley, S., Stout, J.C., Wright, G. a., 2015. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature* 521, 74–76. doi:10.1038/nature14414

Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 303–313. doi:10.1098/rspb.2006.3721

Knipe, D.M., Howley, P.M., 2006. *Fields Virology, Fifth Edition, Volume One*. Lippincott Williams & Wilkins.

Kojima, Y., Toki, T., Morimoto, T., Yoshiyama, M., Kimura, K., Kadowaki, T., 2011. Infestation of Japanese Native Honey Bees by Tracheal Mite and Virus from Non-native European Honey Bees in Japan. *Microb. Ecol.* 62, 895–906. doi:10.1007/s00248-011-9947-z

Koywiwattrakul, P., Thompson, G.J., Sitthipraneed, S., Benjamin, P., Maleszka, R., Koywiwattrakul, P., Thompson, G.J., Sitthipraneed, S., 2005. Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees , *Apis mellifera* Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees , *Apis mellifera* 5, 1–10.

Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0029268

Kukan, B., 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 103–111. doi:10.1006/jipa.1999.4873

Kurze, C., Routtu, J., Moritz, R.F.A., 2016. Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology* 119, 290–297. doi:10.1016/j.zool.2016.03.007

Lamp, B., Url, A., Seitz, K., Eichhorn, J., Riedel, C., Sinn, L.J., Indik, S., Köglberger, H., Rügenapf, T., 2016. Construction and rescue of a molecular clone of Deformed wing virus (DWV). *PLoS One* 11, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0164639

Lanzi, G., de Miranda, J.R., Boniotti, M.B., Cameron, C.E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S.M., Rossi, C., 2006. Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* 80, 4998–5009. doi:10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006

Laurent, M., Hendrikx, P., Ribière-Chabert, M., Chauzat, M.-P., 2015. EPILOBEE: A pan-

European epidemiological study on honeybee colony losses.

- Lauring, A.S., Andino, R., 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog.* 6, 1–8. doi:10.1371/journal.ppat.1001005
- Laurino, D., Manino, A., Patetta, A., Porporato, M., 2013. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bull. Insectology* 66, 119–126.
- Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A., Manino, A., 2011. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: Laboratory tests. *Bull. Insectology* 64, 107–113.
- Lavergne, S., Molina, J., Debussche, M., 2006. Fingerprints of environmental change on the rare mediterranean flora: A 115-year study. *Glob. Chang. Biol.* 12, 1466–1478. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01183.x
- Lazzaro, B.P., 2004. Genetic Basis of Natural Variation in *D. melanogaster* Antibacterial Immunity. *Science* (80-.). 303, 1873–1876. doi:10.1126/science.1092447
- Le Conte, Y., de Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.-C., Bécard, J.-M., 2007. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor* 38, 566–572. doi:10.1051/apido
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M.E., Tarpy, D.R., Caron, D.M., Rose, R., Delaplane, K.S., Baylis, K., Lengerich, E.J., Pettis, J., Skinner, J.A., Wilkes, J.T., Sagili, R., vanEngelsdorp, D., 2015. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie* 46, 292–305. doi:10.1007/s13592-015-0356-z
- Liow, L.H., Van Valen, L., Stenseth, N.C., 2011. Red Queen: From populations to taxa and communities. *Trends Ecol. Evol.* 26, 349–358. doi:10.1016/j.tree.2011.03.016
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., de Miranda, J.R., 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. doi:10.1128/AEM.06094-11
- Locke, B., Le Conte, Y., Crauser, D., Fries, I., 2012. Host adaptations reduce the reproductive success of *varroa destructor* in two distinct european honey bee populations. *Ecol. Evol.* 2, 1144–1150. doi:10.1002/ece3.248
- Long, E.Y., Krupke, C.H., 2016. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nat. Commun.* 7, 1–12. doi:10.1038/ncomms11629
- Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A., Widmer, H., 2001. Chemistry and biology

- of thiamethoxam: A second generation neonicotinoid. *Pest Manag. Sci.* 57, 906–913. doi:10.1002/ps.365
- Manley, R., Boots, M., Wilfert, L., 2015. Emerging viral disease risk to pollinating insects: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *J. Appl. Ecol.* 52, 331–340. doi:10.1111/1365-2664.12385
- Mao, W., Schuler, M. a, Berenbaum, M.R., 2013. Honey constituents up-regulate detoxification and immunity genes in the western honey bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8842–8846. doi:10.1073/pnas.1303884110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1303884110
- Mao, W., Schuler, M. a, Berenbaum, M.R., 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 12657–12662. doi:10.1073/pnas.1109535108
- Maori, E., Paldi, N., Shafir, S., Kalev, H., Tsur, E., Glick, E., Sela, I., 2009. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol. Biol.* 18, 55–60. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x
- Marco Antonio, D.S., Guidugli-Lazzarini, K.R., do Nascimento, A.M., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., 2008. RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften* 95, 953–961. doi:10.1007/s00114-008-0413-9
- Martel, A.-C., Lair, C., 2011. Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91, 978–988. doi:10.1080/03067310903524822
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., Schroeder, D.C., 2012. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* (80-.). 336, 1304–1306. doi:10.1126/science.1220941
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188. doi:10.1016/j.jip.2008.12.001
- Mazzei, M., Carrozza, M.L., Luisi, E., Forzan, M., Giusti, M., Sagona, S., Tolari, F., Felicioli, A., 2014. Infectivity of DWV Associated to Flower Pollen: Experimental Evidence of a Horizontal Transmission Route. *PLoS One* 9, e113448. doi:10.1371/journal.pone.0113448
- McDonnell, C.M., 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. doi:2510.1186/1472-6785-13-25

- Mcvay, J.R., Gudauskas, R.T., Harper, J.D., 1977. Effects of *Bacillus thuringiensis* Nuclear-Polyhedrosis Virus Mixtures on *Trichoplusia ni* Larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 29, 367–372. doi:10.1016/S0022-2011(77)80045-1
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P., 2012. Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science* (80-.). 335, 936–941. doi:10.1126/science.1214935
- Miranda, G.R.B., Raetano, C.G., Silva, E., Daam, M. a., Cerejeira, M.J., 2011. Environmental Fate of Neonicotinoids and Classification of Their Potential Risks to Hypogean, Epygean, and Surface Water Ecosystems in Brazil. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 17, 981–995. doi:10.1080/10807039.2011.588159
- Miranda, J.R. de, Bailey, L., Ball, B. V, Blanchard, P., Budge, G.E., Chejanovsky, N., Chen, Y.P., Gauthier, L., Genersch, E., Graaf, D.C. de, Ribiere, M., Ryabov, E., Smet, L. de, Steen, J.J.M. van der, 2013. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, unpaginated.
- Möckel, N., Gisder, S., Genersch, E., 2011. Horizontal transmission of deformed wing virus : pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route 370–377. doi:10.1099/vir.0.025940-0
- Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., Mercer, A.R., 2014. On the Front Line: Quantitative Virus Dynamics in Honeybee (*Apis mellifera* L.) Colonies along a New Expansion Front of the Parasite *Varroa destructor*. *Plos Pathog.* 10. doi:e100432310.1371/journal.ppat.1004323
- Mondet, F., Le Conte, Y., 2015. Parasites, in: Ritter, W. (Ed.), *Bee Health and the Veterinarian*. World organisation for animal health (OIE), pp. 131–141.
- Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D.J., Ryabov, E. V, 2011. Recombinants between Deformed wing virus and *Varroa destructor* virus-1 may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *J. Gen. Virol.* 92, 156–161. doi:10.1099/vir.0.025965-0
- Mordecai, G.J., Brettell, L.E., Martin, S.J., Dixon, D., Jones, I.M., 2016. Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies 10, 1182–1191. doi:10.1038/ismej.2015.186
- Mordecai, G.J., Wilfert, L., Martin, S.J., Jones, I.M., Schroeder, D.C., 2015. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME J.* 1–10. doi:10.1038/ismej.2015.178

- Morse, R.A., Calderone, N.W., 2000. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. *Bee Cult.* 128, 1–15.
- Mullin, C.A., Frazier, J.L., Pettis, J.S., Vanengelsdorp, D., Frazier, M., Ashcraft, S., Simonds, R., 2010a. Pesticide incidence in 749 wax, pollen and bee samples from North American honey bee colonies. *Figshare*. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009754.t004>
- Mullin, C.A., Frazier, J.L., Pettis, J.S., Vanengelsdorp, D., Frazier, M., Ashcraft, S., Simonds, R., 2010b. Summary of pesticide detections in wax samples from North American honey bee colonies. *Figshare*. doi:<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009754.t001>
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010c. High levels of miticides and systemic agrochemicals in North American beehives: Implications for honey bee health. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 239.
- Mullin, C. a., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High Levels of Mithicides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS One* 5. doi:[10.1371/journal.pone.0009754](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754)
- Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 443–459. doi:[10.1016/j.ibmb.2005.01.014](https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014)
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V.L., Kausmann, M., 2003. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 76, 55–69. doi:[10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)
- Naug, D., Smith, B., 2007. Experimentally induced change in infectious period affects transmission dynamics in a social group. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 61–65. doi:[10.1098/rspb.2006.3695](https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3695)
- Nazzi, F., Brown, S.P., 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. doi:[e100273510.1371/journal.ppat.1002735](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002735)
- Nazzi, F., Pennacchio, F., 2014. Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends Parasitol.* 30, 556–561. doi:[10.1016/j.pt.2014.09.006](https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.09.006)
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Jr, R.E.P., Amdam, G. V, 2007. The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization 5, 1–5. doi:[10.1371/journal.pbio.0050062](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062)
- Neumann, P., Carreck, P., 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1–6.

doi:10.3896/IBRA.1.49.1.01

Nikou, D., Ranson, H., Hemingway, J., 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene* 318, 91–102. doi:10.1016/S0378-1119(03)00763-7

Oldroyd, B.P., 2007. What's Killing American Honey Bees? *PLoS Biol.* 5, e168. doi:10.1371/journal.pbio.0050168

Oliveira, R.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O., 2014. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* 29, 1122–1133. doi:10.1002/tox.21842

Olivier, V., Massou, I., Celle, O., Blanchard, P., Schurr, F., Ribiere, M., Gauthier, M., 2008. In situ hybridization assays for localization of the chronic bee paralysis virus in the honey bee (*Apis mellifera*) brain. *J. Virol. Methods* 153, 232–237. doi:10.1016/j.jviromet.2008.06.027

Pain, J., 1966. NOTE TECHNIQUE NOUVEAU MODELE MAINTIEN D ' ABEILLES EN CAPTIVITE. *Les Ann. l'Abeille, INRA Ed.* 9, 71–76.

Pepe, M.S., Fleming, T.R., 1989. Weighted Kaplan-Meier statistics: a class of distance tests for censored survival data. *Biometrics* 45, 497–507. doi:10.1111/1467-9868.00068

Perry, C.J., Søvik, E., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2016. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E4431–E4431. doi:10.1073/pnas.1610243113

Pettis, J.S., VanEngelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012a. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158. doi:10.1007/s00114-011-0881-1

Pettis, J.S., VanEngelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012b. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158. doi:10.1007/s00114-011-0881-1

Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., Tornier, I., 2013. A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. *PLoS One* 8, e77193. doi:10.1371/journal.pone.0077193

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C. a, Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. a, Noome, D. a, Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Van der Sluijs, J.P., Van Dyck, H., Wiemers,

- M., 2014. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 1–35. doi:10.1007/s11356-014-3471-x
- Poquet, Y., Vidau, C., Alaux, C., 2016. Modulation of pesticide response in honeybees. *Apidologie* 47, 412–426. doi:10.1007/s13592-016-0429-7
- Potts, S., Roberts, S., Dean, R., Marris, G., Brown, M., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.02
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010a. Global pollinator declines : Trends , impacts and drivers Global pollinator declines : trends , impacts and drivers. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007
- Potts, S.G., Neumann, P., Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010b. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe Pérdidas de abejas manejadas y apicultores en Europa. doi:10.3896/ibra.1.49.1.02
- Racaniello, V., Baltimore, D., 1981. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* (80-.). 214, 916–919. doi:10.1126/science.6272391
- Rand, E.E. Du, Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., 2015. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5, 11779. doi:10.1038/srep11779
- Rasmont, P., Franzen, M., Lecocq, T., Harpke, A., Roberts, S.P.M., Biesmeijer, J.C., Castro, L., Cederberg, B., Dvorak, L., Fitzpatrick, U., Gonseth, Y., Haubruge, E., Mahé, G., Manino, A., Michez, D., Neumayer, J., Odegaard, F., Paukkunen, J., Pawlikowski, T., Potts, S.G., Reemer, M., Settele, J., Straka, J., Schweiger, O., 2015. Climatic Risk and Distribution Atlas of European Bumblebees.
- Raymond, C.K., Sims, E.H., Olson, M. V, 2002. Linker-Mediated Recombinational Subcloning of Large DNA Fragments Using Yeast 190–197. doi:10.1101/gr.205201.tire
- Reim, T., Thamm, M., Rolke, D., Blenau, W., Scheiner, R., Reim, T., Thamm, M., Rolke, D., Blenau, W., Suitability, R.S., Eim, T.R., Hamm, M.T., Olke, D.R., Lenau, W.B., 2015. Suitability of three common reference genes for quantitative real-time PCR in honey bees To cite this version : Suitability of three common reference genes for quantitative real-time PCR in honey bees. doi:10.1007/s13592-012-0184-3
- Remnant, E.J., Shi, M., Buchmann, G., Blacquièrre, T., Holmes, E.C., Beekman, M., Ashe, A., 2017. A Diverse Range of Novel RNA Viruses in Geographically Distinct Honey Bee Populations. *J. Virol.* JVI.00158-17. doi:10.1128/JVI.00158-17

- Ribière, M., Lallemand, P., Iscache, a. L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Faucon, J.P., 2007. Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7711–7716. doi:10.1128/AEM.01053-07
- Ribière, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010. Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *J. Invertebr. Pathol.* 103, S120–S131. doi:10.1016/j.jip.2009.06.013
- Rinderer, T.E., Stelzer, J.A., Oldroyd, B.P., Buco, S.M., Rubink, W.L., 1991. Hybridization Between European and Africanized Honey Bees in the Neotropical Yucatan Peninsula. *Science* (80-.). 253, 309–311. doi:10.1126/science.253.5017.309
- Rinkevich, F.D., Margotta, J.W., Pittman, J.M., Danka, R.G., Tarver, M.R., Ottea, J. a., Healy, K.B., 2015. Genetics, Synergists, and Age Affect Insecticide Sensitivity of the Honey Bee, *Apis mellifera*. *PLoS One* 10, e0139841. doi:10.1371/journal.pone.0139841
- Robinson, G.E., 1992. Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 637–665. doi:10.1146/annurev.en.37.010192.003225
- Roffet-Salque, M., Regert, M., Evershed, R.P., Outram, A.K., Cramp, L.J.E., Decavallas, O., Dunne, J., Gerbault, P., Mileto, S., Mirabaud, S., Pääkkönen, M., Smyth, J., Šoberl, L., Whelton, H.L., Alday-Ruiz, A., Asplund, H., Bartkowiak, M., Bayer-Niemeier, E., Belhouchet, L., Bernardini, F., Budja, M., Cooney, G., Cubas, M., Danaher, E.M., Diniz, M., Domboróczki, L., Fabbri, C., González-Urquijo, J.E., Guilaine, J., Hachi, S., Hartwell, B.N., Hofmann, D., Hohle, I., Ibáñez, J.J., Karul, N., Kherbouche, F., Kiely, J., Kotsakis, K., Lueth, F., Mallory, J.P., Manen, C., Marciniak, A., Maurice-Chabard, B., Mc Gonigle, M.A., Mulazzani, S., Özdoğan, M., Perić, O.S., Perić, S.R., Petrasch, J., Pétrequin, A.-M., Pétrequin, P., Poensgen, U., Pollard, C.J., Poplin, F., Radi, G., Stadler, P., Stäuble, H., Tasić, N., Urem-Kotsou, D., Vuković, J.B., Walsh, F., Whittle, A., Wolfram, S., Zapata-Peña, L., Zoughlami, J., 2015. Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature* 527, 226–30. doi:10.1038/nature15757
- Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: Lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255. doi:10.1016/j.tree.2004.03.008
- 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. doi:10.1051/apido:2004071
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016
- Rueppell, O., Hayworth, M.K., Ross, N.P., 2010. Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *J. Evol. Biol.* 23, 1538–1546. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02022.x

- Rueppell, O., Youse, B., Collazo, J., Smith, D., 2017. Early life stress affects mortality rate more than social behavior , gene expression or oxidative damage in honey bee workers 90, 19–25. doi:10.1016/j.exger.2017.01.015
- Rundlöf, M., Andersson, G.K.S., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H.G., 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature* 521, 77–80. doi:10.1038/nature14420
- Ryabov, E. V., Wood, G.R., Fannon, J.M., Moore, J.D., Bull, J.C., Chandler, D., Mead, A., Burroughs, N., Evans, D.J., 2014. A Virulent Strain of Deformed Wing Virus (DWV) of Honeybees (*Apis mellifera*) Prevails after *Varroa destructor*-Mediated, or In Vitro, Transmission. *PLoS Pathog.* 10, e1004230. doi:10.1371/journal.ppat.1004230
- Ryabov, E. V., Keane, G., Naish, N., Evered, C., Winstanley, D., 2009. Densovirus induces winged morphs in asexual clones of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8465–8470. doi:10.1073/pnas.0901389106
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2014. Pesticide Residues and Bees - A Risk Assessment. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0094482
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environ. Int.* 89–90, 7–11. doi:10.1016/j.envint.2016.01.009
- Schmid-Hempel, P., 1998. *Parasites in Social Insects*, Princeton. ed.
- Schneider, C.W., 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. doi:10.1371/journal.pone.0030023
- Schneider, D.S., Ayres, J.S., 2008. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 889–895. doi:10.1038/nri2432
- Schurr, F., Cougoule, N., Rivière, M.-P., Ribière-Chabert, M., Achour, H., Adam, D., Castillo, C., de Graaf, D.C., Forsgren, E., Granato, A., Heinikainen, S., Jurovčíková, J., Kryger, P., Manson, C., Ménard, M.-F., Perennes, S., Schäfer, M.O., Ibañez, E.S.M., Silva, J., Gajger, I.T., Tomkies, V., Toplak, I., Viry, A., Zdańska, D., Dubois, E., 2017. Trueness and precision of the real-time RT-PCR method for quantifying the chronic bee paralysis virus genome in bee homogenates evaluated by a comparative inter-laboratory study. *J. Virol. Methods* 248, 217–225. doi:10.1016/j.jviromet.2017.07.013
- Scott Schneider, S., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, D.R., 2004. *The African Honey Bee*:

- Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 351–376. doi:10.1146/annurev.ento.49.061802.123359
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G. V., 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 962–967. doi:10.1073/pnas.0502681103
- Shutler, D., Head, K., Burgher-MacLellan, K.L., Colwell, M.J., Levitt, A.L., Ostiguy, N., Williams, G.R., 2014. Honey Bee *Apis mellifera* Parasites in the Absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor* Mites. *PLoS One* 9, e98599. doi:10.1371/journal.pone.0098599
- Siede, R., Meixner, M.D., Büchler, R., 2012. Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* 51, 320–328. doi:10.3896/IBRA.1.51.4.05
- Sikorski, R.S., Hieter, P., 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27. doi:0378111995000377 [pii]
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. a D., Morrissey, C. a, Noome, D. a, Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, a, Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5–34. doi:10.1007/s11356-014-3470-y
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., Minsart, L.A., Mouret, C., Hautier, L., 2014. Honeybee Colony Disorder in Crop Areas: The Role of Pesticides and Viruses. *PLoS One* 9. doi:e10307310.1371/journal.pone.0103073
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M., Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M., 2016. RESIN COLLECTION AND SOCIAL IMMUNITY IN HONEY BEES 63, 3016–3022. doi:10.1111/j.1558-5646.2009.00772.x
- Singh, R., Levitt, A.L., Rajotte, E.G., Holmes, E.C., Ostiguy, N., VanEngelsdorp, D., Lipkin, W.I., DePamphilis, C.W., Toth, A.L., Cox-Foster, D.L., 2010. RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-*Apis* Hymenopteran Species. *PLoS One* 5, e14357. doi:10.1371/journal.pone.0014357
- Škubník, K., Nováček, J., Füzik, T., Přidal, A., Paxton, R.J., Plevka, P., 2017. Structure of deformed wing virus, a major honey bee pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 3210–3215. doi:10.1073/pnas.1615695114

- Smith, M.R., Singh, G.M., Mozaffarian, D., Myers, S.S., 2015. Effects of decreases of animal pollinators on human nutrition and global health: a modelling analysis. *Lancet* 386, 1964–1972. doi:10.1016/S0140-6736(15)61085-6
- Soucha-Machado, V., 1982. Inheritance and breeding potential of triazine tolerance and resistance in plants. *Herbic. Resist. Plants* 257–273.
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., Dainat, B., 2015. Overwintering Is Associated with Reduced Expression of Immune Genes and Higher Susceptibility to Virus Infection in Honey Bees. *PLoS One* 10, e0129956. doi:10.1371/journal.pone.0129956
- Stephenson, G.R., 2003. Pesticide Use and World Food Production: Risks and Benefits, in: *Proceedings of the 2000 National Meeting of the Expert Committee on Weeds Comité D'experts En Malherbologie*. pp. 261–270. doi:10.1021/bk-2003-0853.ch015
- Stevenson, C.S., Docx, C., Webster, R., Battram, C., Hynx, D., Giddings, J., Cooper, P.R., Chakravarty, P., Rahman, I., Marwick, J.A., Kirkham, P.A., Charman, C., Richardson, D.L., Nirmala, N.R., Whittaker, P., Butler, K., Cs, S., Docx, C., Webster, R., Battram, C., Hynx, D., Pr, C., Chakravarty, P., Rahman, I., Ja, M., Charman, C., Dl, R., Nr, N., Whittaker, P., Butler, K., 2007. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation 1183–1193. doi:10.1152/ajplung.00105.2007.
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482–6.
- Tehel, A., Brown, M.J.F., Paxton, R.J., 2016. Impact of managed honey bee viruses on wild bees. *Curr. Opin. Virol.* 19, 16–22. doi:10.1016/j.coviro.2016.06.006
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2004. Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7185–7191. doi:10.1128/AEM.70.12.7185
- Tepfer, M., Gaubert, S., Leroux-Coyau, M., Prince, S., Houdebine, L.-M., 2004. Transient expression in mammalian cells of transgenes transcribed from the Cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Environ. Biosafety Res.* 3, 91–97. doi:10.1051/ebr:2004010
- Thompson, H.M., Wilkins, S., Harkin, S., Milner, S., Walters, K.F.A., 2015. Neonicotinoids and bumblebees (*Bombus terrestris*): Effects on nectar consumption in individual workers. *Pest Manag. Sci.* 71, 946–950. doi:10.1002/ps.3868
- Tison, L., Hahn, M.-L., Holtz, S., Rössner, A., Greggers, U., Bischoff, G., Menzel, R., 2016.

Honey Bees' Behavior Is Impaired by Chronic Exposure to the Neonicotinoid Thiacloprid in the. doi:10.1021/acs.est.6b02658

Traynor, K.S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D., VanEngelsdorp, D., 2016. Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 47, 325–347. doi:10.1007/s13592-016-0431-0

Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H.S., Malena, D.A., Gajiwala, P.H., Maciukiewicz, P., Fournier, V., Zayed, A., 2017. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* (80-.). 356, 1395–1397. doi:10.1126/science.aam7470

van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.M., Belzunces, L.P., 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 5, 293–305. doi:10.1016/j.cosust.2013.05.007

Vance, J.T., Williams, J.B., Elekonich, M.M., Roberts, S.P., 2009. The effects of age and behavioral development on honey bee (*Apis mellifera*) flight performance. *J. Exp. Biol.* 212, 2604–2611. doi:10.1242/jeb.028100

vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Donovall, L., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Tarpy, D.R., Hayes, J., Pettis, J.S., 2009. “Entombed Pollen”: A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 147–149. doi:10.1016/j.jip.2009.03.008

VanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80–S95.

VanEngelsdorp, D., Tarpy, D.R., Lengerich, E.J., Pettis, J.S., 2013. Idiopathic brood disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Prev. Vet. Med.* 108, 225–233. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.08.004

Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550

Villarreal, L.P., 2004. Are Viruses Alive? *Sci. Am.* 291, 100–105. doi:10.1038/scientificamerican1204-100

Wang, D., Moeller, F.E., 1970. Comparison of the Free Amino Acid Composition

Hemolymph of Healthy and Nosemu-Infected Female Honey Bees 1 202–206.

Weinstock, G.M., Robinson, G.E., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Weinstock, G.M., Robinson, G.E., Worley, K.C., Evans, J.D., Maleszka, R., Robertson, H.M., Weaver, D.B., Beye, M., Bork, P., Elsik, C.G., Evans, J.D., Hartfelder, K., Hunt, G.J., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Maleszka, R., Weinstock, G.M., Worley, K.C., Zdobnov, E.M., Hartfelder, K., Amdam, G. V., Bitondi, M.M.G., Collins, A.M., Cristino, A.S., Evans, J.D., Michael, H., Lattorff, G., Lobo, C.H., Moritz, R.F.A., Nunes, F.M.F., Page, R.E., Simões, Z.L.P., Wheeler, D., Carninci, P., Fukuda, S., Hayashizaki, Y., Kai, C., Kawai, J., Sakazume, N., Sasaki, D., Tagami, M., Maleszka, R., Amdam, G. V., Albert, S., Baggerman, G., Beggs, K.T., Bloch, G., Cazzamali, G., Cohen, M., Drapeau, M.D., Eisenhardt, D., Emore, C., Ewing, M.A., Fahrback, S.E., Forêt, S., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Hauser, F., Hummon, A.B., Hunt, G.J., Huybrechts, J., Jones, A.K., Kadowaki, T., Kaplan, N., Kucharski, R., Lebouille, G., Linial, M., Littleton, J.T., Mercer, A.R., Page, R.E., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Richmond, T.A., RodriguezZas, S.L., Rubin, E.B., Sattelle, D.B., Schlipalius, D., Schoofs, L., Shemesh, Y., Sweedler, J. V., Velarde, R., Verleyen, P., Vierstraete, E., Williamson, M.R., Beye, M., Ament, S.A., Brown, S.J., Corona, M., Dearden, P.K., Dunn, W.A., Elekonich, M.M., Elsik, C.G., Forêt, S., Fujiyuki, T., Gattermeier, I., Gempe, T., Hasselmann, M., Kadowaki, T., Kage, E., Kamikouchi, A., Kubo, T., Kucharski, R., Kunieda, T., Lorenzen, M., Maleszka, R., Milshina, N. V., Morioka, M., Ohashi, K., Overbeek, R., Page, R.E., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Ross, C.A., Schioett, M., Shippy, T., Takeuchi, H., Toth, A.L., Willis, J.H., Wilson, M.J., Robertson, H.M., Zdobnov, E.M., Bork, P., Elsik, C.G., Gordon, K.H.J., Letunic, I., Hackett, K., Peterson, J., Felsenfeld, A., Guyer, M., Solignac, M., Agarwala, R., Cornuet, J.M., Elsik, C.G., Emore, C., Hunt, G.J., Monnerot, M., Mougél, F., Reese, J.T., Schlipalius, D., Vautrin, D., Weaver, D.B., Gillespie, J.J., Cannone, J.J., Gutell, R.R., Johnston, J.S., Elsik, C.G., Cazzamali, G., Eisen, M.B., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Hauser, F., Hummon, A.B., Iyer, V.N., Iyer, V., Kosarev, P., Mackey, A.J., Maleszka, R., Reese, J.T., Richmond, T.A., Robertson, H.M., Solovyev, V., Souvorov, A., Sweedler, J. V., Weinstock, G.M., Williamson, M.R., Zdobnov, E.M., Evans, J.D., Aronstein, K.A., Bilikova, K., Chen, Y.P., Clark, A.G., Decanini, L.I., Gelbart, W.M., Hetru, C., Hultmark, D., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Kimura, K., Lazzaro, B.P., Lopez, D.L., Simuth, J., Thompson, G.J., Zou, Z., De Jong, P., Sodergren, E., Csürös, M., Milosavljevic, A., Johnston, J.S., Osoegawa, K., Richards, S., Shu, C.-L., Weinstock, G.M., Elsik, C.G., Duret, L., Elhaik, E., Graur, D., Reese, J.T., Robertson, H.M., Robertson, H.M., Elsik, C.G., Maleszka, R., Weaver, D.B., Amdam, G. V., Anzola, J.M., Campbell, K.S., Childs, K.L., Collinge, D., Crosby, M.A., Dickens, C.M., Elsik, C.G., Gordon, K.H.J., Gramates, L.S., Grozinger, C.M., Jones, P.L., Jorda, M., Ling, X., Matthews, B.B., Miller, J., Milshina, N. V., Mizzen, C., Peinado, M.A., Reese, J.T., Reid, J.G., Robertson, H.M., Robinson, G.E., Russo, S.M., Schroeder, A.J., St Pierre, S.E., Wang, Y., Zhou, P., Robertson, H.M., Agarwala, R., Elsik, C.G., Milshina, N. V., Reese, J.T., Weaver, D.B., Worley, K.C., Childs, K.L., Dickens, C.M., Elsik, C.G., Gelbart, W.M., Jiang, H., Kitts, P., Milshina, N. V., Reese, J.T., Ruef, B., Russo, S.M., Venkatraman, A., Weinstock, G.M., Zhang, L., Zhou, P., Johnston, J.S., Aquino-Perez, G., Cornuet, J.M., Monnerot, M., Solignac, M., Vautrin, D., Whitfield, C.W., Behura, S.K., Berlocher, S.H., Clark, A.G., Gibbs, R.A., Johnston, J.S., Sheppard, W.S., Smith, D.R., Suarez, A. V., Tsutsui, N.D., Weaver, D.B., Wei, X., Wheeler, D., Weinstock, G.M., Worley, K.C., Havlak, P., Li, B., Liu, Y., Sodergren, E., Zhang, L., Beye, M., Hasselmann, M., Jolivet, A., Lee, S., Nazareth, L. V., Pu, L.-L., Thorn, R., Weinstock, G.M., Stolc, V., Robinson, G.E., Maleszka, R., Newman, T., Samanta, M.,

- Tongprasit, W.A., Aronstein, K.A., Claudianos, C., Berenbaum, M.R., Biswas, S., de Graaf, D.C., Feyereisen, R., Johnson, R.M., Oakeshott, J.G., Ranson, H., Schuler, M.A., Muzny, D., Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Chacko, J., Davis, C., Dinh, H., Gill, R., Hernandez, J., Hines, S., Hume, J., Jackson, L., Kovar, C., Lewis, L., Miner, G., Morgan, M., Nazareth, L. V., Nguyen, N., Okwuonu, G., Paul, H., Richards, S., Santibanez, J., Savery, G., Sodergren, E., Svatek, A., Villasana, D., Wright, R., 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949. doi:10.1038/nature05260
- Wells, T., Wolf, S., Nicholls, E., Groll, H., Lim, K.S., Clark, S.J., Swain, J., Osborne, J.L., Haughton, A.J., 2016. Flight performance of actively foraging honey bees is reduced by a common pathogen 0. doi:10.1111/1758-2229.12434
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* (80-). 336, 351–352. doi:10.1126/science.1215025
- Williams, I.H., 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agric. Zool. Rev.*
- Wilson-Rich, N., Dres, S.T., Starks, P.T., 2008. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 54, 1392–1399. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.07.016
- Winston, M.L., 1987. *The biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wolf, S., Nicholls, E., Reynolds, A.M., Wells, P., Lim, K.S., Paxton, R.J., Osborne, J.L., 2016. Optimal search patterns in honeybee orientation flights are robust against emerging infectious diseases. *Nat. Publ. Gr.* 1–10. doi:10.1038/srep32612
- Woyciechowski, M., Moron, D., 2009. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Insectes Soc.* doi:10.1007/s00040-009-0012-6
- Wragg, D., Marti-Marimon, M., Basso, B., Bidanel, J.-P., Labarthe, E., Bouchez, O., Le Conte, Y., Vignal, A., 2016. Whole-genome resequencing of honeybee drones to detect genomic selection in a population managed for royal jelly. *Sci. Rep.* 6, 27168. doi:10.1038/srep27168
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 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. doi:10.1016/j.jip.2012.01.005
- Xu, C., Li, C.Y., Kong, A.T., 2005. Induction of Phase I , II and III Drug Metabolism /

Transport by Xenobiotics 28, 249–268.

Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7470–7475. doi:10.1073/pnas.0501860102

Youssef, I., 2016. Contribution à la mise en place d'un système de génétique inverse pour le virus de la paralysie chronique de l'abeille. Université Aix Marseille.

Youssef, I., Schurr, F., Goulet, A., Cougoule, N., Ribière-Chabert, M., Darbon, H., Thiéry, R., Dubois, E., 2015. RNA 1 and RNA 2 Genomic Segments of Chronic Bee Paralysis Virus Are Infectious and Induce Chronic Bee Paralysis Disease. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–8. doi:10.1155/2015/423493

Yu, S.J., Robinson, F.A., Nation, J.L., 1984. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 360–368. doi:10.1016/0048-3575(84)90029-4

Yue, C., Genersch, E., 2005. RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86, 3419–3424. doi:10.1099/vir.0.81401-0

Zioni, N., Soroker, V., Chejanovsky, N., 2011. Replication of varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. *Virology* 417, 106–112. doi:10.1016/j.virol.2011.05.009

Rôle des interactions virus/pesticides dans le déclin des abeilles

Les abeilles domestiques subissent des pertes de colonies sans précédents, ce qui pourrait à terme avoir un fort impact économique compte tenu de leur apport à l'agriculture en service de pollinisation. Ces pertes sont définies comme causées par des stress multifactoriels. Cependant, l'impact de ces stress est en général testé séparément sur les individus ou les colonies. Les colonies sont connues pour concentrer les pesticides provenant de l'environnement à travers le pollen et le nectar récoltés mais aussi les pathogènes. L'étude de la co-exposition entre le thiaméthoxam, un insecticide néonicotinoïde, et deux virus de l'abeille, le DWV et le CBPV, a mis en évidence l'existence d'interactions entre chacun de ces virus et le pesticide. Diverses méthodes de transmission des virus ont été testées afin de s'approcher au mieux des conditions naturelles et une méthode de transmission du CBPV par contact répétable a été développée. Une cinétique de métabolisation du thiaméthoxam a été effectuée pour la première fois, renseignant sur la forte probabilité d'excrétion du métabolite en conditions naturelles. Lors d'expérimentations en cagettes la co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam à fortes doses chroniques a causé des mortalités synergiques, ou une augmentation des charges virales atteignant le seuil en nombre de copies virales connu pour déclencher des infections apparentes chez les abeilles. Les différences de résultats entre des abeilles provenant de colonies dans diverse conditions a souligné un effet de tolérance aux stress encore non étudié chez l'abeille domestique. En parallèle, la co-exposition au sein de la colonie entre le thiaméthoxam à une dose subléthale aigue et le DWV a causé des premières sorties de butinage extrêmement précoces chez les abeilles, ainsi que de fortes proportions de premiers vols sans retour, ce qui pourrait à terme avoir un effet dévastateur sur les colonies. L'étude de la transcription de gènes suggère que les effets obtenus sur les charges virales en CBPV seraient dus à un effet du thiaméthoxam sur *dorsal-1a*, un facteur de l'immunité, et les sorties précoces à une baisse significative de la transcription de la vitellogénine, entrant en jeu dans les mécanismes de vieillissement, due au DWV. Le développement de clones moléculaires du DWV a été amorcé, ce qui pourra à terme permettre des études de génétique inverse sur ce virus, qui pourront expliquer ses modes de transmission et d'infections encore inconnus à ce jour.

Mots clés : néonicotinoïde, virus, co-exposition, synergie, infection apparente, effets comportementaux, tolérance

Role of virus/pesticides interactions in honey bee decline

Domestic honeybees are suffering from unprecedented colony losses, which could at term have a strong economic impact, considering their part in crop pollination, notably. These losses are defined as caused by multifactorial stresses. However, the impact of these stresses is usually measured separately, on individuals or colonies. Colonies are known to concentrate pesticides from their environment through collection of pollen and nectar, but they also concentrate pathogens. The study of a co-exposure between thiamethoxam, a neonicotinoid insecticide, and two honeybee viruses, DWV and CBPV, has shed light on the existence of interactions between each of these viruses and the pesticide. Different virus transmission methods have been tested to be as close as natural conditions, and a repeatable CBPV transmission method through contact has been developed. Metabolisation kinetics of thiamethoxam have been obtained for the first time, underlining the strong probability for excretion of the metabolite in natural conditions. During caged experiments, the co-exposure experiments between thiamethoxam at high chronic doses and CBPV cause synergistic mortalities, or an increase in viral loads which reached the number of viral copies threshold associated with clinical signs in bees. The varying results between bees from colonies kept in different conditions underlined a stress tolerance effect yet to be studied in the honeybee. In parallel, co-exposure in colonies between sublethal doses of thiamethoxam and DWV caused extremely precocious first foraging trips in bees, as well as large proportions of bees never returning to the hive after their first exit, which both could in the end have a devastating effect on the colonies. The study of gene transcripts suggests that the obtained effects on CBPV viral loads could be due to a negative effect of thiamethoxam on *dorsal-1a*, an immune factor, and the precocious trips to a significant down-regulation of vitellogenin, which takes part in honeybee aging, cause by DWV. The development of molecular clones of DWV and a DWV recombinant was initiated, which will in the future allow for reverse genetics studies on this virus, which will help explain their transmission and infection mechanisms that are still unknown to this day.

Key words: neonicotinoid, virus, co-exposure, synergy, overt infections, behavioural effects, tolerance