



HAL
open science

Stress in honeybees (*Apis mellifera*): physiological and behavioural modifications

Célia Bordier

► **To cite this version:**

Célia Bordier. Stress in honeybees (*Apis mellifera*): physiological and behavioural modifications. Agricultural sciences. Université d'Avignon, 2017. English. NNT: 2017AVIG0687 . tel-01685248

HAL Id: tel-01685248

<https://theses.hal.science/tel-01685248>

Submitted on 16 Jan 2018

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

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



UR 406 Abeilles et Environnement



Le stress chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*) : analyse des modifications physiologiques et comportementales



Célia BORDIER

Thèse de Doctorat, soutenue publiquement le 19 Mai 2017

Devant un jury composé de :

Yves Le Conte

Cédric Alaux

Jean-Christophe Sandoz

Nicolas Châline

Mathieu Lihoreau

Séverine Suchail

(Directeur de recherche, INRA, Avignon)

(Chargé de recherche, INRA, Avignon)

(Directeur de recherche, CNRS, Paris)

(Professeur, Université de Sao Paulo, Brésil)

(Chargé de recherche, CNRS, Toulouse)

(Maître de conférence, Université d'Avignon)

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

REMERCIEMENTS

Une thèse est un travail de longue haleine, impossible à mener à bien sans les nombreuses rencontres, les nombreux échanges professionnels mais aussi sans la bienveillance des gens qui nous entourent. Bien entendu j'aimerais pouvoir remercier tout le monde, au moins au même niveau de ce que chacun m'a apporté mais vu le nombre de personnes que j'ai côtoyé pendant cette thèse, je vais déjà essayer de n'oublier personne.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse **Cédric Alaux** et **Yves Le Conte** pour m'avoir donné la chance de réaliser ce projet et pour m'avoir laissé une liberté dans l'élaboration de mes expérimentations. J'espère avoir maintenant toutes les cartes en main pour pouvoir continuer dans cette voie.

Merci à **Jean Christophe Sandoz** et **Nicolas Châline** d'avoir accepté de réviser ce travail. Merci également à **Mathieu Lihoreau** et **Séverine Suchail** d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Merci à **Jean-Marc Devaud**, porteur de l'ANR qui a financée ma thèse et **David Biron** pour leur écoute et leurs conseils avisés à chacune de nos rencontres, notamment lors des comités de thèse.

Thanks to **Andrew Barron** for welcoming me in your lab, an amazing experience under the down. Thanks also to all of my co-workers in Australia, especially **Amélie**, **Simon** and **Suzie**, for sure my experience would not have been the same without you. I learned a lot with you, in only 3 months and I only keep the positive of this experience.

Merci à **Maryline** pour nos nombreuses discussions constructives, en statistiques mais pas que.

Merci à **Mercedes** sans qui la plupart de mes expérimentations auraient été très difficiles à réaliser. Ta douceur et ta bienveillance ont concrètement eu une part importante dans ma thèse. Travailler à tes côtés a été très formateur mais également un vrai bonheur.

Merci à **Didier** pour m'avoir appris les rudiments de l'apiculture mais surtout pour m'avoir permis d'utiliser tes compteurs, sans parler de ton inconditionnelle bonne humeur, même pendant de longues séries de marquage !!

Merci à **Domi** et **Emma** de m'avoir transmis tout ce que vous connaissez en chimie, y compris les petits trucs et astuces.

Merci à **Michel**, pour ton ingénierie et ta disponibilité pour mettre au jour des dispositifs expérimentaux à partir de nos idées des fois un peu folles.

Merci **Nicolas** pour ton soutien logistique, ça y est maintenant nous pouvons dire qu'il l'a fait, il a tenu jusqu'au bout sans black out.

Merci **Samuel** pour m'avoir initié à la modélisation, un nouveau domaine bien vaste.

Merci à **Séverine** de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et pour ton optimisme constant, indéniablement une source de motivation.

Merci à **Magali** et **Dominique** pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans l'enseignement, une respiration dans la frénésie de la thèse.

Merci à **Orianne** qui a gentiment pris le relais lors de séries interminables de relevés de mortalité, 84 jours c'est long !!

Merci à mes 23 co-bureaux qui ont inexorablement contribué à l'animation du 'bureau des artistes', et qui pour la plupart devraient se retrouver un peu plus bas, patience ...

Merci à tous les thésards et post-doc, de plus ou moins longue date pour les discussions très constructives autour de nos projets respectifs.

Merci à **Alice**, ma première co-bureau et mon anagramme aussi, forcément un signe pour que cela fonctionne. Ton peps nous a, je crois bien aidé.

Merci à **Suzanna**, le petit papillon portugais, ton sourire et ta joie de vivre sont vraiment communicatifs. Aller, accroche toi tu vas la réussir aussi cette thèse.

Merci à **Marianne** (thésarde), malgré une suite un peu compliquée, je n'oublie pas nos bons moments partagés au début, professionnels ou non, comme cette nocturne au Louvre.

Merci à **Coline** de m'avoir fait découvrir les rouages de la durabilité, à quand une étude sur la durabilité de la santé mentale pendant la thèse, parce qu'il faut bien l'avouer, ça peut rendre un peu fou.

Merci à **Hélène** pour ces heures passées en plein mistral ou en plein cagnard, pour la science !! Tu as été et resteras ma première stagiaire, j'ai eu beaucoup de chance de trouver une fille motivée et curieuse pour prendre part à mon projet de thèse. Tu sais où tu veux aller alors fonce, quoi qu'en disent les autres.

Merci de m'avoir accueilli à l'ApiTricot. Et voilà que dès le début, je me lançais dans 2 grandes activités, démêler les fils de ma thèse et les fils de mes pelotes. J'espère que cette thèse nous permettra d'agrandir la collection de bouchons !!

Merci à **Marianne**, chef tricot et toujours à l'écoute de nos petits maux. A chaque fois que je prends mes aiguilles je pense à toi et je pense que cela va me rester très longtemps. Merci également pour tes relectures de dernière minute.

Merci **Mathilde** pour nos parties de tennis endiablées mais aussi pour tout le reste, tu es la reine des gâteaux de crêpes !!

Merci **Fanny** pour ton aide précieuse, que ce soit sur le terrain, en labo ou en stat. Merci pour ton optimisme, ton soutien et pour me permettre de continuer ma route.

Merci à **Constance, Laure, Axelle, Alban, Yannick** et **Guillaume**, petit groupe tellement important pour moi et qui nous a ouvert les bras, rien que pour cela merci. Mais ce n'est pas tout, vous m'avez apporté tellement plus, votre soutien, votre bienveillance, vos conseils ... Que dire de nos soirées, rien de mieux pour lâcher un peu et libérer les zygomatiques. C'est sûr la fin de thèse ne marque en aucun cas la fin de cette histoire.

Merci à **Cam** et **Alice**, pour simplement avoir continué à être présentes malgré la distance et le manque de temps.

Merci à **Claire** et **Vincent** de m'avoir permis de faire mes premiers pas dans la recherche, d'affiner mon projet et de m'avoir incité à continuer.

Un jour quelqu'un m'a dit que sans les fondations, impossible de construire quelque chose de solide. J'ai eu la chance d'en avoir de très bonnes. Alors pour votre soutien, pour avoir cru en moi, et pour m'avoir laissé partir dans un milieu un peu loin de vos sensibilités, un grand grand merci à mes **parents**.

Merci à ma **sœurette** de 6 ans de plus !! Ce n'est pas un exercice facile d'exprimer son ressenti et il faut bien dire que ça a parfois été maladroit mais, malgré nos divergences, tu as toujours été mon modèle !!

Merci à toute ma **famille** et ceux que je considère comme tel (les Coucou, Hontebeyrie et Puppi) pour avoir toujours cru en moi, m'avoir poussé à poursuivre dans cette voie quitte à ce que cela nous éloigne un temps.

Il en est pour qui il devient compliqué de trouver les mots justes. **Gaëtan**, comment te remercier pour tout ce que tu m'apportes au quotidien et pour ton soutien immuable ? Tu es ma source d'inspiration depuis déjà tant d'année et tu as su me porter et me supporter pendant ces 3 années, pour tout cela, merci.

Une pensée émue pour les personnes qui étaient présentes au début de ce projet et qui malheureusement n'en verront pas la concrétisation, **Sandrine, Eva** et **Tonton**, la voie de la sagesse.

Je ne peux tourner la page de cette thèse sans remercier toutes les abeilles qui ont contribué largement à la concrétisation de ce projet et qui ont su me rendre la pareille !!

Pour terminer, merci à toute l'équipe de l'unité Abeilles et Environnement de m'avoir accueilli pendant ces 3 ans et quelque et une dernière fois, merci à tous.

ARTICLES

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*.
doi: 10.1007/s13592-016-0475-1.

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. *Journal of Insect Physiology*, 98: 47-54.

Bordier C., Dechatre H., Suchail S., Perussi M., Soubeyrand S., Pioz M., Pélissier M., Crauser D., Le Conte Y., Alaux C. Colony adaptive response to simulated heat waves and consequences at the individual level in honeybees (*Apis mellifera*).
Accepté dans le journal Scientific Reports.

Bordier C., Klein S., Le Conte Y., Alaux C., Barron A. Stress decreases pollen forager performance in honeybees. *En préparation*.

COMMUNICATIONS

Présentations orales

1. **3^{ème} Journées de la recherche apicole.** Février 2015, Paris, France.

Bordier C., Pioz M., Crauser D., Le Conte Y., Alaux C.

« *Le comportement de dérive, chez des abeilles saines et malades, capturé par compteur optique* ».

2. **28^{ème} congrès de l'UIEIS - section française.** Août 2015, Tours, France.

Bordier C., Pioz M., Crauser D., Le Conte Y., Alaux C.

« *Drifting behaviour of healthy and Nosema-parasitized bees record with optical counters* ».

« *Le comportement de dérive chez les abeilles saines et parasitées, suivi par compteur optique* ».

3. **12th Ecology & Behaviour.** Juin 2016, Lyon, France.

Bordier C., Pioz M., Suchail S., Crauser D., Le Conte Y., Alaux C.

« *Effects of simulated heat waves on honeybees* »

4. **XXV International Congress of Entomology.** Septembre 2016, Orlando, USA.

Bordier C., Pioz M., Suchail S., Crauser D., Le Conte Y., Alaux C.

« *Effects of simulated heat waves on honeybees (Apis mellifera)* »

Posters

1. **3rd International Conference on Pollinator Biology, Health and Policy.** Juillet 2016, Penn State, USA.

Klein S., Vine P., **Bordier C.,** Devaud J.M., Lihoreau M., Barron A.

« *Impacts of miticides on honey bee foraging behaviour and visual learning* »

ABREVIATIONS

ACP	Analyse en composante principale
AICc	corrected Akaike's information criterion
AKH	Adipokinetic hormone (Hormone adipokinétique)
<i>akhr</i>	receptor to the adipokinetic hormone (récepteur à l'hormone adipokinétique)
ANOVA	Analysis of variance (Analyse de la variance)
cDNA	Complimentary deoxyribonucleic acid (Acide désoxiribonucléique complémentaire)
CI	Confidence Interval (Intervalle de confiance)
COSY	Correlation spectroscopy
Ct	Threshold cycle (Cycle seuil)
DA	Dopamine
DEB	Dynamic energy budget
Df	Degrees of freedom (Degrés de liberté)
DWV	Deformed wing virus (Virus des ailes déformées)
Eif3-S8	Eukaryotic translation initiation factor 3 – subunit 8
EO	Ethyl oleate (Oléate d'éthyle)
GAS	General adaptation syndrome (Syndrome général d'adaptation)
GLMM	General linear mixed model (ou GLMER) (Modèle linéaire mixte généralisé)
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMDB	Human metabolome database
HPIC	High pressure ion chromatography (Chromatographie ionique haute pression)
HPLC	High pressure liquide chromatography (Chromatographie liquide haute pression)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Groupe intergouvernemental sur le changement climatique)
JH	Juvenile Hormone (Hormone juvénile)
<i>jhe</i>	juvenile hormone esterase (hormone juvénile estérase)
JRES	J-resolved
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
LD	Lethal dose (Dose létale)
LMER	Linear mixed model (Modèle linéaire mixte)

NA	Non available (Non disponibles)
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
OA	Octopamine
PCR	Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)
PLS-DA	Analyse discriminante des moindres carrés partiels
PPO	Prophenoloxidase
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RNA	Ribonucleic acid (Acide ribonucléique)
SBV	Sacbrood virus (Virus du couvain sacciforme)
SHW	Simulated heat waves (vagues de chaleur simulées)
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TYR	Tyrosine
Vg	Vitellogenin (Vitellogénine) (protéine)
vg	vitellogenin (vitellogénine) (gène)
5-HT	Serotonin (Sérotonine)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	iii
ARTICLES	vi
COMMUNICATIONS.....	vii
ABREVIATIONS.....	viii
SOMMAIRE	x
Liste des figures	xii
Liste des tables.....	xiv

CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE	1
I. QU'EST-CE QU'UN STRESS ?	3
I.1. PHASE D'ALARME.....	3
I.2. PHASE DE RESISTANCE.....	4
I.3. PHASE D'EPUISEMENT.....	4
I.4. EVOLUTION DU CONCEPT DE STRESS	4
I.5. LE STRESS ET L'INSECTE	5
II. POURQUOI ETUDIER LE STRESS CHEZ L'ABEILLE ?.....	7
II.1. EXPOSITION A DE MULTIPLES PRESSIONS ENVIRONNEMENTALES.....	7
II.2. UN INSECTE SOCIAL	8
III. ORGANISATION SOCIALE CHEZ L'ABEILLE.....	9
III.1. CASTES LIEES A LA REPRODUCTION.....	9
III.2. CASTES COMPORTEMENTALES	9
III.2.1. DIVISION DU TRAVAIL LIEE A L'AGE	9
III.2.2. MECANISMES INFLUENÇANT LE DEVELOPPEMENT COMPORTEMENTAL.....	10
III.3. PHYSIOLOGIE ASSOCIEE AUX CASTES COMPORTEMENTALES.....	11
III.3.1. VITELLOGENINE ET HORMONE JUVENILE.....	11
III.3.2. RESERVES ENERGETIQUES	12
III.3.3. COGNITION ET AMINES BIOGENES	13
IV. À QUELS STRESS LES ABEILLES SONT-ELLES EXPOSEES ?	14
IV.1. XENOBIOTIQUES.....	14
IV.2. PATHOGENES ET REPNSES IMMUNITAIRES	15
IV.2.1. MECANISMES GENERAUX DE DEFENSE IMMUNITAIRE.....	15
IV.2.2. CONSEQUENCES	16
IV.3. VARIATIONS CLIMATIQUES.....	17
IV.3.1. LA THERMOREGULATION ACTIVE : UNE PROTECTION CONTRE LES VARIATIONS CLIMATIQUES	17
IV.3.2. IMPACT SUR LE METABOLISME	18
V. OBJECTIFS DE LA THESE	19

CHAPITRE II. REPONSES PHYSIOLOGIQUES SELON LE TYPE DE STRESS ET LA CASTE COMPORTEMENTALE

21

I. AVANT-PROPOS.....	23
-----------------------------	-----------

II. IMPACTS DE STRESS BIOTIQUES OU ABIOTIQUES SUR LA PHYSIOLOGIE DES ADULTES	24
II.1. REPONSE AU STRESS AU NIVEAU PHYSIOLOGIQUE ET ENERGETIQUE	24
II.2. DONNEES COMPLEMENTAIRES SUR LE STRESS SOCIAL	41
III. IMPACTS DE STRESS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES SUR LE METABOLOME DES EMERGENTES	47
IV. CONCLUSION	56
CHAPITRE III. REPONSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS IMMUNITAIRE ET PATHOLOGIQUE	59
I. AVANT-PROPOS.....	61
II. IMPACT D'UN PATHOGENE SUR LE COMPORTEMENT DE DERIVE.....	64
III. IMPACT D'UN STRESS IMMUNITAIRE NON-PATHOGENIQUE.....	79
IV. CONCLUSIONS	88
CHAPITRE IV. REPONSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS THERMIQUE	91
I. AVANT-PROPOS.....	93
II. QUEL EST L'IMPACT DE VAGUES DE CHALEURS SUR LE COMPORTEMENT DE BUTINAGE DE LA COLONIE	94
III. CONCLUSIONS	115
CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE.....	117
I. BILAN	119
II. COUT ENERGETIQUE ASSOCIE A UNE REPONSE AU STRESS	120
II.1. SENSIBILITE AU SUCRE	120
II.2. IMPACT AU NIVEAU COMPORTEMENTAL	121
II.3. METABOLISME ENERGETIQUE VS RESSOURCE ENERGETIQUE	123
III. SENSIBILITE AU STRESS	124
III.1. IMPACT DES FACTEURS INTERNES	124
III.2. GRADIENT D'INTENSITE DU STRESS	124
IV. PERSPECTIVES	126
IV.1. IMPACT DU STRESS SUR LA PERCEPTION ET REPONSE AUX SIGNAUX SOCIAUX.....	126
IV.2. VOIES DE SIGNALEMENT DE LA REPONSE AU STRESS.....	126
IV.3. APPROFONDIR NOS CONNAISSANCES SUR L'EFFET DU STRESS AU NIVEAU COMPORTEMENTAL	127
IV.3.1. Réversion du comportement de butinage.....	127
IV.3.3. Investissement dans le partage de la ressource.....	128
V. CONCLUSIONS.....	129
REFERENCES	131

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE

FIGURE I - 1. FACTEURS AYANT UN IMPACT SUR LA SANTE DE L'ABEILLE	7
FIGURE I - 2. POLYETHISME D'AGE DES OUVRIERES.....	9
FIGURE I - 3. ILLUSTRATION DES DIFFERENTES CASTES COMPORTEMENTALES.....	10
FIGURE I - 4. ONTOGENIE DU COMPORTEMENT CHEZ LES OUVRIERES ET PHYSIOLOGIE ASSOCIEE.	11
FIGURE I - 5. PREDICTION DU NOMBRE DE JOURS DE VAGUES DE CHALEUR L'ETE EN FRANCE.....	17
FIGURE I - 6. THERMOREGULATION DU NID CHEZ L'ABEILLE.	18

CHAPITRE II. REPONSES PHYSIOLOGIQUES SELON LE TYPE DE STRESS ET LA CASTE COMPORTEMENTALE

FIGURE II - 1. THERMOGRAM OF A HONEYBEE.....	30
FIGURE II - 2. GENE EXPRESSION LEVELS OF VITELLOGENIN AND JUVENILE HORMONE ESTERASE IN RESPONSE TO STRESS IN DIFFERENT BEHAVIOURAL CASTES.....	32
FIGURE II - 3. HEATMAPS OF VITELLOGENIN AND JUVENILE HORMONE ESTERASE EXPRESSION LEVELS FROM BEES EXPOSED TO DIFFERENT STRESS.	33
FIGURE II - 4. GENE EXPRESSION LEVELS OF VITELLOGENIN AND JUVENIL HORMONE ESTERASE FOLLOWING PESTICIDE EXPOSURE IN DIFFERENT BEHAVIOURAL CASTES.	34
FIGURE II - 5. ENDOTHERMIC PERFORMANCE OF BEES AS A FUNCTION OF STRESS AND TASK SPECIALISATION.....	35
FIGURE II - 6. HEAD/THORAX AND ABDOMEN GLYCOGEN LEVELS ACCORDING TO STRESS AND TASK SPECIALISATION.....	36
FIGURE II - 7. GENE EXPRESSION LEVELS OF THE ADIPOKINETIC HORMONE RECEPTOR IN RESPONSE TO STRESS IN DIFFERENT BEHAVIOURAL CASTES.	36
FIGURE II - 8. NIVEAUX D'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR LA VITELLOGENINE ET L'HORMONE JUVENILE ESTERASE EN REPONSE A L'ISOLEMENT SOCIAL POUR CHAQUE CASTE COMPORTEMENTALE.	42
FIGURE II - 9. PERFORMANCES ENDOTHERMIQUES DES ABEILLES EN FONCTION DU TRAITEMENT ET DE LA CASTE COMPORTEMENTALE.	43
FIGURE II - 10. NIVEAUX DE GLYCOGENE DANS L'ENSEMBLE TETE/THORAX ET DANS L'ABDOMEN SUITE A UN ISOLEMENT SOCIAL ET EN FONCTION DE LA CASTE COMPORTEMENTALE.....	44
FIGURE II - 11. NIVEAUX D'EXPRESSION DU GENE CODANT POUR LE RECEPTEUR A L'HORMONE ADIPOKINETIQUE EN REPONSE A UN STRESS ET SELON LA CASTE COMPORTEMENTALE.....	45
FIGURE II - 12. EFFET DU TRAITEMENT SUR LA PROBABILITE DE SURVIE DES ABEILLES.	51
FIGURE II - 13. CONSOMMATION DE POLLEN PAR ABEILLE.	52
FIGURE II - 14. CONSOMMATION DE SOLUTION SUCREE PAR ABEILLE.....	52
FIGURE II - 15. HEATMAP DE L'INTENSITE RELATIVE DES METABOLITES DANS L'HEMOLYPHE DES ABEILLES.	53

CHAPITRE III. REPONSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS IMMUNITAIRE ET PATHOLOGIQUE

FIGURE III - 1. DISPOSITIFS DE MARQUAGE INDIVIDUEL DES ABEILLES POUR LE SUIVI AUTOMATIQUE.	62
FIGURE III - 2. FONCTIONNEMENT DU COMPTEUR OPTIQUE.	62
FIGURE III - 3. DISPOSITIF RFID UTILISE DANS L'ETUDE DU STRESS IMMUNITAIRE SIMPLE.....	63
FIGURE III - 4. CUMULATIVE NUMBER OF DRIFTS PER BEE AS A FUNCTION OF AGE AND TREATMENT.	73
FIGURE III - 5. CUMULATIVE DRIFT DURATION PER BEE AS A FUNCTION OF AGE AND TREATMENT.	74
FIGURE III - 6.EFFECT OF NOSEMA PARASITISM ON BEE SURVIVAL.	75
FIGURE III - 7. EFFECT OF DRIFTING PERFORMANCE ON BEE SURVIVAL.....	75
FIGURE III - 8. EFFECT OF IMMUNE CHALLENGE ON BEE 'SURVIVAL PROBABILITY'.	83
FIGURE III - 9. FORAGING TRIP CHARACTERISTICS IN RESPONSE TO STRESS.	85
FIGURE III - 10. BRAIN BIOGENIC AMINES LEVELS IN RESPONSE TO STRESS IN DIFFERENT FORAGER GROUPS.	85

CHAPITRE IV. REPOSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS THERMIQUE	
FIGURE IV - 1. VARIATIONS IN COLONY TEMPERATURE.	102
FIGURE IV - 2. FIT OF THE AUTOREGRESSIVE CONDITIONAL POISSON MODEL TO THE TIME SERIES.	103
FIGURE IV - 3. MEAN MORNING EFFECTS VERSUS MEAN AFTERNOON EFFECTS ESTIMATED FROM THE AUTOREGRESSIVE CONDITIONAL POISSON MODEL.	105
FIGURE IV - 4. PROPORTION OF POLLEN, NECTAR, WATER FORAGERS AND EMPTY BEES ACCORDING TO THE SHW TREATMENTS.	106
FIGURE IV - 5. HAEMOLYMPH SUGAR LEVELS ACCORDING TO THE SHW TREATMENTS.	107
FIGURE IV - 6. FRUCTOSE, GLUCOSE AND TREHALOSE LEVELS IN BEE HAEMOLYMPH.	107
FIGURE IV - 7. GLYCOGEN LEVELS IN WHOLE BEES ACCORDING TO THE SHW TREATMENTS.	108
FIGURE IV - 8. GENE EXPRESSION LEVELS ACCORDING TO THE SHW TREATMENTS.	109
FIGURE IV - 9. VITELLOGENIN EXPRESSION LEVELS OVER THE SUCCESSIVE SHW PERIODS.	109
FIGURE IV - 10. DEFORMED WING VIRUS LOADS ACCORDING TO THE SHW TREATMENTS.	110
FIGURE IV - 11. DEFORMED WING VIRUS LOAD OVER THE SUCCESSIVE SHW PERIODS.	110

LISTE DES TABLES

CHAPITRE III. REPONSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS IMMUNITAIRE ET PATHOLOGIQUE

TABLE III - 1. DRIFTING CHARACTERISTICS AT THE COLONY LEVEL AND ACCORDING TO PARASITISM AND COLONY.....	70
TABLE III - 2. MIXED MODELS FITTED TO ANALYZE VARIATION IN DRIFTING BEHAVIOR.....	71
TABLE III - 3. ESTIMATED COEFFICIENTS AND 95% CONFIDENCE INTERVAL (CI) OF THE SELECTED MODELS (SEE TABLE III-2) INVESTIGATING THE INFLUENCE OF PARASITISM, AGE AND COLONY POSITION ON DRIFTING BEHAVIOUR.....	72
TABLE III - 4. MIXED MODELS FITTED TO ANALYSE THE IMPACT OF IMMUNE CHALLENGE ON FORAGING BEHAVIOUR.....	84

CHAPITRE IV. REPONSES COMPORTEMENTALES : IMPACT D'UN STRESS THERMIQUE

TABLE IV _ 1. PRIMER PAIRS USED FOR QUANTITATIVE PCR OF HONEYBEE GENES AND VIRUS.....	100
TABLE IV _ 2. ESTIMATES OF BASIC NUMBER OS EXITS (α) AND AUTO-CORRELATION PARAMETER (β) FROM THE AUTOREGRESSIVE CONDITIONAL POISSON MODEL.....	104

CHAPITRE I ● ○ ○ ○ ○

Introduction générale



I. Qu'est-ce qu'un stress ?

L'utilisation du terme 'stress' est largement répandue dans nos sociétés. Cependant il existe une ambiguïté concernant la définition que chacun donne à ce qu'il considère être du stress. Cette complexité se retrouve dans la littérature scientifique, le terme 'stress' y étant utilisé de manière variable (Kemeny, 2003). Selon les publications, ce terme peut aussi bien représenter *i)* le stimulus qui menace l'intégrité physiologique de l'organisme en créant un déséquilibre homéostatique, *ii)* la réponse physiologique ou comportementale mise en place pour contrer le stimulus ou *iii)* les conséquences physiologiques. Tout au long de cette thèse, nous avons considéré le stress comme étant le stimulus à l'origine des perturbations de l'intégrité physique des individus.

L'individu doit percevoir correctement la nature de la perturbation, afin de mettre en place une réponse appropriée via une cascade d'adaptations physiologiques et comportementales. Soit il peut s'adapter à la situation pour rester dans son environnement de vie, en développant des réponses physiologiques spécifiques. Soit l'individu perçoit que les conditions sont trop extrêmes et que s'adapter lui sera trop coûteux alors il va chercher à éviter ces conditions, par exemple en migrant dans un environnement plus favorable, s'il en est capable. Ainsi comme cela a été mentionné par Darwin ce n'est pas l'espèce la plus forte qui survie, ni la plus intelligente mais celle qui s'adapte le mieux aux changements ('it is not the strongest of the species that survive, nor the most intelligent, but the one most responsive to change'). Ce processus d'adaptation a été conceptualisé sur le modèle du rat, par Selye (1950) sous la forme d'un 'syndrome général d'adaptation' comportant 3 phases : l'alarme (mobilisation des ressources), la résistance (utilisation des ressources) et l'épuisement dans les cas extrêmes (troubles somatiques).

I.1. Phase d'alarme

La réponse au stress commence par une 'phase d'alarme', c'est l'étape de perception du stimulus, et de mise en place d'une réaction d'urgence. Cela se traduit, chez les mammifères par une hyperactivation des systèmes sympathique et corticotrope (Chrousos and Gold, 1992; Pacak and Palkovits, 2001; Smith and Vale, 2006). Cette première réaction induit la sécrétion de corticoïdes et d'adrénaline permettant d'amorcer une mobilisation énergétique en vue de préparer l'animal à une augmentation de son activité. La mobilisation des substrats énergétiques se fait par glycolyse puis lipolyse dans le foie et les muscles ce qui aboutit à une libération de sucres dans le sang (Charmandari et al., 2005; Sved et al., 2002). Cette énergie est principalement orientée vers les organes qui interviennent dans l'effort adaptatif (cerveau et muscle). Parallèlement à cette hyperactivation, et à la mise en place de processus physiologiques

permettant à l'organisme de lutter contre la source de stress, les systèmes physiologiques n'intervenant pas dans la réponse au stress (reproduction et croissance) sont momentanément inhibés (Kemeny, 2003). Chez les animaux, ces réactions physiologiques peuvent aussi s'accompagner d'un comportement ('fight or flight', attaque ou fuite d'après Walter Cannon (1935) qui vise à soustraire l'organisme au stimulus stressant.

I.2. Phase de résistance

Si le stress persiste, l'individu va entrer dans un second temps, dans une 'phase de résistance'. Cela implique une accentuation de l'activité des systèmes noradrénergique et corticotrope. Une intensification de la mobilisation énergétique, via notamment la production de sucres, est donc observée. Pour caractériser les changements physiologiques accompagnant cette phase, Selye a utilisé le terme d'« hétérostasie », en opposition à l'homéostasie décrivant ainsi un déséquilibre dans les fonctions propres de l'individu.

I.3. Phase d'épuisement

Dans le cas où il devient plus difficile pour l'organisme de lutter contre la source de stress, soit à cause d'une intensification du stimulus, soit parce que la situation persiste trop longtemps, l'individu peut entrer dans une 'phase d'épuisement'. Lors de cette phase, les ressources énergétiques de l'organisme s'amenuisent peu à peu entraînant une fatigue du système et donc un épuisement. Dans les cas les plus extrêmes, cet état peut induire un risque de mortalité.

I.4. Evolution du concept de stress

Le modèle décrit par Selye suggère qu'il existe des mécanismes de perception du stress chez les organismes afin de renseigner sur la nature et l'intensité de la perturbation et ainsi développer une réponse appropriée. Ceci va avoir un effet direct sur les principales fonctions de l'organisme. Le stress va supprimer la physiologie et le comportement lié à la reproduction, la digestion et l'immunité tout en augmentant les niveaux d'activité, le rythme cardiaque et la mobilisation énergétique (Johnson and White, 2009).

Cependant sur la base du syndrome général d'adaptation, il a longtemps été considéré qu'un stimulus négatif induisait des réponses physiologiques aspécifiques donc similaires quel qu'en soit sa nature. Depuis, des études ont mis en lumière que la réponse des individus pouvait dépendre à la fois de la génétique et de la physiologie de l'organisme visé. De plus, le contexte social, la spécificité et la soudaineté du stress peuvent influencer sur la perception faite par un individu donné. Par exemple, chez l'homme lorsqu'un stress est perçu comme étant incontrôlable, la libération de cortisol devient plus importante que si le stress avait été perçu

comme contrôlable (Dickerson and Kemeny, 2004). Le cortisol étant la principale hormone de groupe des glucocorticoïdes, c'est un médiateur du stress important chez la plupart des mammifères. Il en est de même avec la prédictibilité puisqu'il a été montré chez les ovins que le rythme cardiaque des individus change selon que le stimulus est prévisible ou non (Désiré et al., 2006; Greiveldinger et al., 2007). Enfin la présence de conspécifiques peut diminuer la réponse aux perturbations environnementales (Hennessy et al., 2009). Ces caractéristiques spécifiques de la réponse au stress ont été démontrées tant en laboratoire que lors d'expérimentations en milieu naturel. Tout ceci a eu pour conséquence d'élargir le concept de base du stress.

Tous ces mécanismes de réponses et leurs conséquences sur les organismes ont été très étudiés chez les mammifères mais assez peu chez les insectes pour lesquels nous avons besoin de mieux comprendre les réponses et la tolérance au stress. Cela apparaît d'autant plus important si nous nous plaçons dans le cadre des changements globaux actuels qui affectent les insectes, maillons essentiels des écosystèmes naturels et agricoles. De plus cela nous permettrait d'avoir une compréhension élargie et globale du phénomène.

I.5. Le stress et l'insecte

La presque totalité des études sur les voies de signallement et de réponse au stress a été menée chez les mammifères. Cependant dans les années 1980-1990, des travaux ont montré que les voies de signallement du système opioïde, impliquées dans les réponses physiologiques au stress, existaient également chez les invertébrés (Jaffe and Blanco, 1994; Kavaliers et al., 1987; Núñez et al., 1998, 1983; Zabala et al., 1984). Ces études indiquent que les insectes peuvent eux aussi exprimer des réponses au stress. En effet, sur la base du syndrome général d'adaptation décrit par Selye chez les mammifères, il a été montré qu'il existait chez les insectes (Johnson and White, 2009) et notamment les abeilles (Even et al., 2012), des processus physiologiques et voies moléculaires sous-jacentes jouant un rôle dans l'adaptation aux stress. Les insectes sont donc capables de répondre et de s'adapter face à des perturbations de leur environnement. Il existe également des homologues fonctionnelles entre les mammifères et les insectes (par exemple : foie/corps gras; sang/hémolymphe) qui suggèrent des mécanismes de réponse similaires chez les insectes.

Concernant les similitudes, tout d'abord comportementales, les réponses individuelles peuvent prendre la forme d'agression ou de fuite, que ce soit chez les mammifères ou les insectes (Ivanovic, 1991; Johnson and White, 2009).

De plus, tout comme cela a déjà été démontré chez les mammifères, il semblerait que chez les insectes, des voies neuroendocrines soient impliquées dans les réponses générales au stress (Ivanovic, 1991; Johnson and White, 2009). Une régulation neuro-hormonale complexe peut, par exemple, être mise en place pour préparer les individus à répondre au stress par la mobilisation

des ressources énergétiques dont dispose l'individu (Even et al., 2012). Ainsi, bien que les insectes possèdent un système nerveux relativement simple, des mécanismes physiologiques complexes leur permettent d'explorer un répertoire comportemental sophistiqué. De ce fait, les insectes représentent un modèle d'intérêt pour comprendre les mécanismes sous-jacents à la réponse au stress (Johnson and White, 2009).

Etudier les mécanismes de réponses au stress chez les insectes permettrait donc une avancée dans la compréhension des adaptations et processus physiologiques impliqués dans la réponse générale d'adaptation. Cela pourrait permettre à plus ou moins long-terme d'améliorer la tolérance et la résilience des individus face à un stress.

II. Pourquoi étudier le stress chez l'abeille ?

II.1. Exposition à de multiples pressions environnementales

Les abeilles sont exposées à un nombre croissant de pressions environnementales (Goulson et al., 2015). Certaines d'entre elles, comme les virus (Cox-Foster et al., 2007), les pathogènes (Cornman et al., 2012; Evans and Schwarz, 2011; Francis et al., 2013) ou les pesticides (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Van der Sluijs et al., 2013) ont été identifiées comme pouvant impacter la vitalité des colonies (Figure I-1). Dans ce contexte, des pertes significatives de colonies d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) sont reportées chaque année à travers le monde (Neumann and Carreck, 2010; Potts et al., 2010). Cependant, l'abeille ayant un rôle majeur dans le maintien de la biodiversité et des agrosystèmes via la pollinisation (Gallai et al., 2009), nous avons assisté à une augmentation de son utilisation comme agent de pollinisation. Ainsi, dans certaines régions, les services de pollinisation sont inférieurs aux besoins. Par exemple en Europe, la demande en pollinisation par les abeilles domestiques augmente environ 5 fois plus vite que les stocks de colonies disponibles (Breeze et al., 2014). Ainsi comprendre les réponses physiologiques et comportementales suite à une exposition à ces différentes sources de stress devient urgent, d'autant plus que leurs modes d'actions et leurs conséquences sur l'abeille sont très vraisemblablement variables.

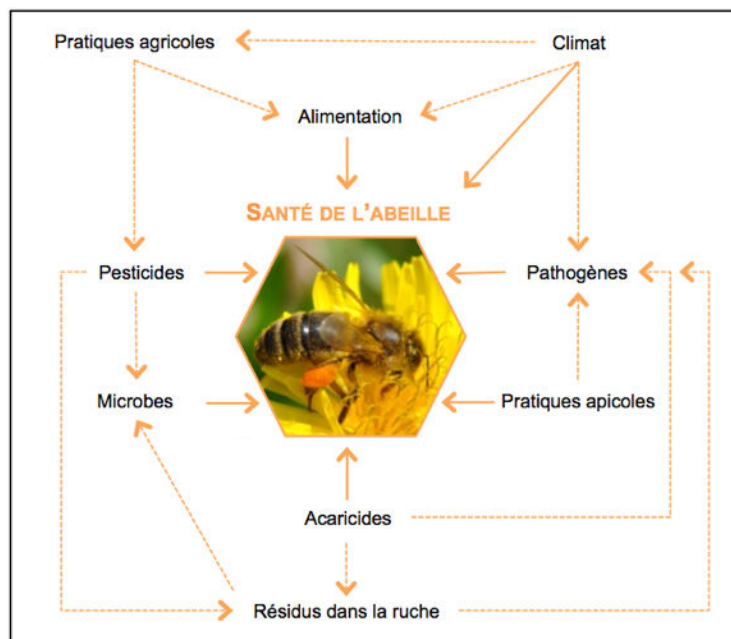


Figure I - 1. Facteurs ayant un impact sur la santé de l'abeille

Selon le facteur considéré l'impact peut être direct (flèche pleine) ou indirect (flèche pointillée). Les résidus dans la ruche, représentent les résidus de pesticides issus de traitements dans la colonie ou sur les cultures visitées et qui s'accumulent dans les différentes matrices, pollen, nectar, cire. Schéma adapté de OPERA Bee health in Europe, 2013.

II.2. Un insecte social

À l'image des insectes en général, l'abeille possède les caractéristiques physiologiques lui permettant de mettre en place des réponses adaptées en fonction de son environnement. Cependant d'autres paramètres vont pouvoir influencer sa réponse au stress, comme son organisation sociale, ce qui fait de l'abeille un modèle tout à fait intéressant pour l'étude du stress.

En effet, les abeilles domestiques ayant développé un mode de vie social basé sur la coopération des individus dans le soin apporté au couvain (ensemble des individus immatures), la division du travail liée à la reproduction et le chevauchement des générations, elles sont définies comme des insectes sociaux (Michener, 1969). Elles vivent dans un nid leur procurant un environnement clos où les individus interagissent et coopèrent pour maintenir des conditions internes optimales, quel que soit les conditions environnementales. Une colonie d'abeilles est donc une société à part entière, qui se compose de 15 000 à 80 000 individus. Ainsi la réponse à un stress va se faire non seulement dans l'intérêt de l'individu mais également dans celui de la colonie.

III. Organisation sociale chez l'abeille

III.1. Castes liées à la reproduction

Le terme de caste est habituellement utilisé pour décrire les groupes d'individus déterminés en fonction de leur statut reproducteur. Chez l'abeille domestique, trois castes cohabitent :

- *la reine* : seule femelle reproductrice qui assure le renouvellement et la cohésion de la colonie
- *les mâles* ou faux bourdons dont la principale fonction est la fécondation de reines vierges
- *les ouvrières* stériles, qui peuvent toutefois pondre des œufs non fécondés

Au cours de leur vie, les ouvrières peuvent s'engager dans différentes fonctions afin d'assurer le développement de la colonie, par le soin au couvain, la défense de la colonie ou le butinage (Wilson, 1971). À un moment donné de leur vie, les ouvrières se spécialisent dans une tâche précise. Ainsi une seconde division du travail s'opère chez les ouvrières (Seeley, 1982), dans ce cas nous parlons de castes comportementales.

III.2. Castes comportementales

III.2.1. Division du travail liée à l'âge

Même si la génétique joue une part importante dans la division du travail, certains génotypes prédisposant les abeilles à la réalisation de certaines tâches (Robinson and Page, 1989, 1988), la transition d'une tâche vers une autre est principalement liée à l'âge, ce qui est décrit comme le 'polyéthisme d'âge' (Figure I-2).

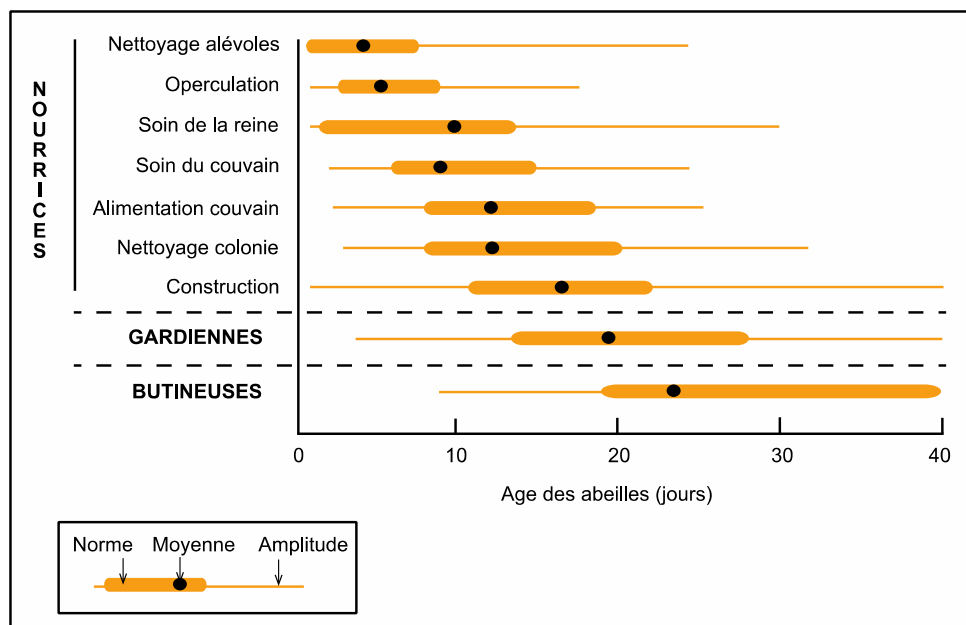


Figure I - 2. Polyéthisme d'âge des ouvrières.

Âge moyen (point noir), âge le plus commun (trait orange épais) ainsi que l'étendue moyenne (trait orange fin) de l'exécution des tâches (adapté de Wilson, 1971).

En effet, chez l'abeille toutes les ouvrières ont la même morphologie (Winston, 1987) et la répartition des tâches repose sur le principe de polyéthisme temporel ou d'âge (Harvell, 1994; Nicholas and Calderone, 1998). Les jeunes abeilles réalisent des tâches, comme le nettoyage, la construction des alvéoles ou encore l'alimentation du couvain. Ces abeilles qui prennent soin à la fois de la reine ou du couvain sont des nourrices. Environ 2 semaines après l'émergence, une partie des abeilles (15 %), se spécialise dans des tâches de défense de la colonie (Moore et al., 1987). Ces abeilles examinent, à l'aide de leurs antennes, les abeilles qui entrent dans la ruche, repoussent les abeilles étrangères et les prédateurs. Ces abeilles au comportement caractéristique sur la planche d'envol sont des gardiennes. À la fin de leur vie les abeilles deviennent butineuses, ce sont elles qui ramènent à la colonie les ressources nécessaires à son développement, comme l'eau, le nectar, le pollen et la propolis (Seeley, 1995; Winston, 1987) (Figure I-3).

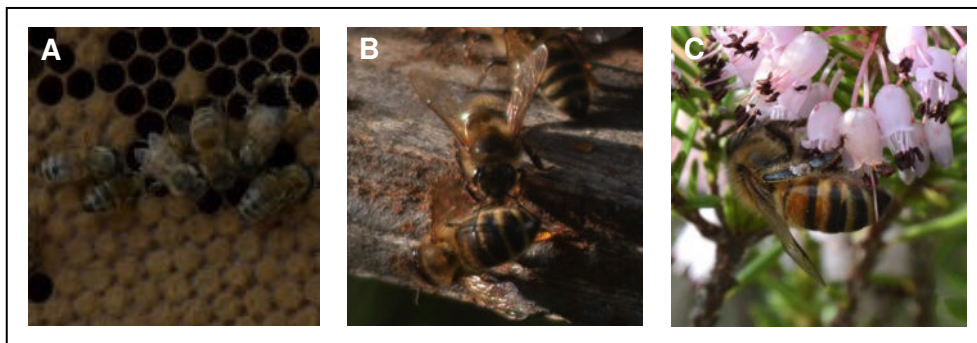


Figure I - 3. Illustration des différentes castes comportementales.

Au cours de leur vie les abeilles peuvent être (A) nourrices, (B) gardiennes ou (C) butineuses. Photos : © C. Bordier.

III.2.2. Mécanismes influençant le développement comportemental

Ce polythéisme d'âge n'est pas fixe mais peut varier selon les besoins de la colonie. En effet, l'ontogénie des ouvrières est caractérisée par une grande flexibilité. La division du travail est un mécanisme socialement dynamique. Le développement comportemental peut être accéléré, retardé ou inversé en fonction du contexte social et des besoins directs de la colonie (Amdam, 2011; Robinson, 1992). Si le ratio nourrices/butineuses devient déséquilibré des ajustements au niveau social sont fait. Dans le cas où la colonie manque de butineuses, les jeunes abeilles vont accélérer leur développement comportemental et ainsi commencer les activités de butinage précocement. Ce comportement est également observé lors de l'exposition de la colonie à des stress (cf. partie sur les stress ci-dessous). Inversement si la colonie compte trop de butineuses par rapport à ses besoins, les nourrices ralentissent leur développement (Huang and Robinson, 1996). Dans le cas d'une réversion, les anciennes butineuses redevenues nourrices, semblent toutefois être moins efficaces dans l'élevage du couvain (Robinson, 1992). Ainsi, bien que ces abeilles soient en mesure de réactiver des glandes devenues inactives, comme les glandes

hypopharyngiennes (Herb et al., 2012), certains aspects de la transition seraient irréversibles comme la perte en réserves lipidiques (Robinson, 1992). Cependant ces abeilles restent en mesure de participer à la thermorégulation du couvain (Robinson, 1992).

Dans ce contexte de régulation sociale, la transition entre les différentes tâches est régulée essentiellement via la production de phéromones (Alaux et al., 2010; Slessor et al., 2005). L'une des principales phéromones intervenant dans cette régulation est l'oléate d'éthyle (EO = Ethyl Oleate). Ce composé, majoritairement produit par les butineuses, ralentit le développement comportemental des nourrices (Leoncini et al., 2004). L'EO fait également parti des composés émis par la reine (Keeling and Slessor, 2005) et le couvain (Le Conte et al., 1990), et de la même manière inhibe la maturation comportementale vers le stade de butineuse (Leoncini et al., 2004).

III.3. Physiologie associée aux castes comportementales

La transition de la tâche de nourrice vers celle de butineuse s'accompagne de profondes modifications physiologiques, notamment endocriniennes, métaboliques et neuronales (Robinson, 2002).

III.3.1. Vitellogénine et hormone juvénile

Les niveaux de vitellogénine (Vg), qui sont inversement corrélés à ceux de l'hormone juvénile (JH), sont élevés chez les nourrices et faibles chez les butineuses (Robinson, 1987). La Vg et la JH étant impliquées dans la régulation du développement comportemental (Nelson et al., 2007; Sullivan et al., 2000), les nourrices et les butineuses peuvent être discriminées sur la base de cette caractéristique physiologique (Figure I-4).

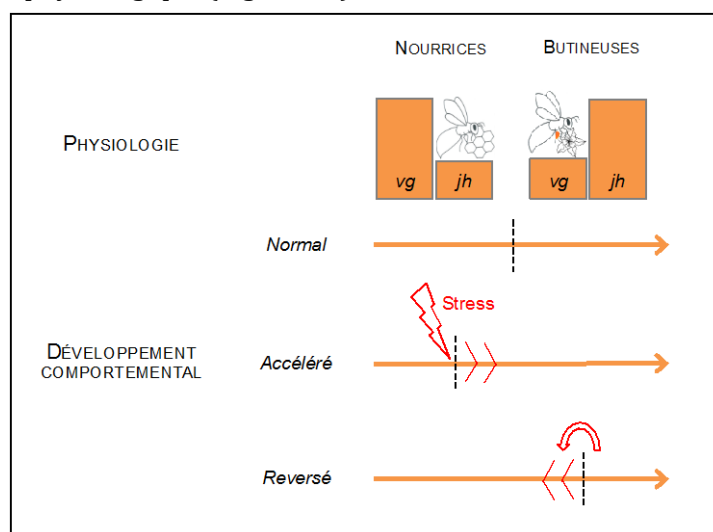


Figure I - 4. Ontogénie du comportement chez les ouvrières et physiologie associée.

Selon le principe du polyéthisme d'âge les abeilles vont évoluer du stade de nourrice à celui de butineuse avec un changement de physiologie. Les ouvrières sont capables d'accélérer leur développement

comportemental suite à un stress ou de reverser en fonction des besoins de la colonie (selon Amdam, 2011).

La vitellogénine est impliquée dans la production de nourriture larvaire au niveau des glandes hypopharyngiennes (Amdam et al., 2003). La Vg a aussi un rôle de protection des cellules contre le stress oxydatif et a un effet positif sur la longévité des ouvrières (Seehuus et al., 2006). Elle est impliquée dans d'autres fonctions chez l'abeille, comme la régulation du métabolisme énergétique en tant que protéine de stockage (Fluri et al., 1982), et la mise en place des défenses immunitaires (Amdam et al., 2004a; Amdam, 2011).

L'hormone juvénile chez les insectes, affecte des paramètres clés de l'histoire de vie des individus comme la croissance ou encore le développement morphologique et comportemental (Clark and Galef, 1995; Moore, 1991; Nijhout, 1994; Roff, 1986; Silver, 1993). Chez l'abeille la JH est surtout connue pour avoir un rôle dans le développement cognitif et comportemental des individus (Robinson, 1987). Le taux de JH augmente avec l'âge des abeilles et ainsi, selon la maturation comportementale. Une augmentation de JH est observée au moment du premier butinage (Huang and Robinson, 1992; Rachinsky and Hartfelder, 1990; Robinson, 1987). La JH a également un rôle au niveau cognitif puisqu'elle est impliquée dans l'augmentation de neurohormones comme l'octopamine.

Le ratio entre la Vg et la JH permet de déterminer le profil comportemental des abeilles. La Vg par son rôle dans la protection des dommages oxydatifs et son effet positif sur la survie, va potentiellement apporter une résistance plus grande dans les situations de stress. Ainsi les nourrices avec un taux de Vg supérieur à celui de JH devraient être moins sensibles à un stress que les butineuses (Amdam, 2011).

III.3.2. Réserves énergétiques

Les changements physiologiques chez les ouvrières vont notamment avoir pour conséquence d'augmenter les capacités de vol des abeilles au moment de la transition vers une activité de butinage. Cela inclut une diminution d'environ 40 % de la masse corporelle qui se localise principalement au niveau de l'abdomen (Harrison, 1986). La transition entre nourrice et butineuse est également caractérisée par une augmentation du glycogène stocké dans les tissus. Les butineuses stockent approximativement 50 % plus de glycogène que les nourrices dans leur thorax (Harrison, 1986; Neukirch, 1982). Le glycogène étant une des ressources énergétiques principale pour les muscles impliqués dans le vol, cette modification permet aux abeilles de se préparer à une augmentation de leur activité lors de la transition vers un stade de butineuse. La diminution de la masse des individus combinée à une augmentation des niveaux de glycogène stocké pourrait avoir plusieurs avantages pour les ouvrières, comme par exemple d'augmenter la charge maximale de ressources collectées en un vol, tout en couvrant les coûts

énergétiques liés au butinage.

Cette perte de poids provient en partie d'une baisse de moitié des réserves lipidiques contenues dans les corps gras (Wilson-Rich et al., 2008), site de synthèse de la vitellogénine. Les butineuses ont donc des réserves en lipides, moins importantes que les nourrices (Toth and Robinson, 2005). Ces réserves lipidiques sont ainsi directement associées au développement comportemental des ouvrières. Cependant, les butineuses qui redeviennent nourrices, ne reforment pas leurs réserves lipidiques et sont donc moins efficaces dans le soin au couvain que des nourrices ordinaires (Robinson, 1992).

Ainsi, il est possible que la réduction des corps gras et des réserves lipidiques associée à un changement de comportement, ait un double effet, positif sur les performances de vol des individus et négatif sur la survie.

III.3.3. Cognition et amines biogènes

Les amines biogènes sont impliquées dans la division du travail. Les niveaux d'octopamine (OA) sont plus élevés dans le cerveau des butineuses que dans celui des nourrices (Schulz and Robinson, 2001; Schulz et al., 2002), et les abeilles traitées avec de l'OA deviennent butineuses de manière précoce (Schulz and Robinson, 2001). L'OA est également connue pour augmenter la réponse au sucre (Scheiner et al., 2002) et stimuler l'activité de vol (Fussnecker et al., 2006), deux caractéristiques de l'activité de butinage.

Les variations dans la réponse au sucre sont corrélées au type de ressources butinées (eau, pollen et nectar) et à l'apprentissage. Par exemple, le seuil de sensibilité au sucre est associé au type de ressource collectée : les butineuses d'eau étant plus sensibles au sucre que les butineuses de nectar (seuil de réponse plus bas), et les butineuses de pollen ayant une sensibilité intermédiaire (Pankiw and Page, 2000). De plus, les abeilles les plus sensibles au sucre ont de meilleures capacités d'apprentissage (Scheiner et al., 2003). Ainsi, parmi les butineuses des différences existent, celles qui collectent du pollen sont plus performantes au niveau de l'apprentissage associatif, que celles qui collectent du nectar (Scheiner et al., 2004, 2003). Par ailleurs, la sensibilité au sucre est aussi dépendante de l'âge et augmente au cours de la vie des abeilles (Pankiw and Page, 1999). Les butineuses développent donc des capacités cognitives supérieures aux nourrices, ce qui est essentiel pour s'orienter lors du butinage (navigation et localisation de ressources, vol de retour)

Le stress peut également avoir un impact sur la sensibilité au sucre. Ainsi, si la sensibilité au sucre des abeilles, et donc le type de ressources qu'elles collectent une fois butineuses est influencé par le génotype (Pankiw and Page, 2000), une pression environnementale comme une exposition à des pesticides peut affecter cette sensibilité et potentiellement les préférences de butinage (Démare et al., 2016).

IV. À quels stress les abeilles sont-elles exposées ?

IV.1. Xénobiotiques

Un large spectre de pesticides est utilisé dans le contrôle des nuisibles tant en agriculture qu'en apiculture. Ces pesticides ou leurs métabolites peuvent s'accumuler dans les matrices de la ruche, que ce soit dans le miel, le pollen ou la cire (Johnson, 2015; Mullin et al., 2010). Ainsi, sur les sites de butinage ou au sein de la ruche, les abeilles se retrouvent fréquemment exposées à des composés chimiques de différents types (fongicides, herbicides, acaricides, insecticides) et ayant des effets multiples. Au-delà de l'effet sur la survie des individus, l'impact des pesticides peut être sublétalement avec des effets au niveau moléculaire, physiologique et cognitif.

L'exposition aux pesticides peut avoir un impact sur le système endocrinien et donc sur le développement comportemental. Une première étude sur l'impact d'une exposition au coumaphos ou au fluvalinate n'a pas montré de variabilité dans l'expression de la vitellogénine et de l'hormone juvénile (Schmehl et al., 2014). Cependant une récente étude a montré une régulation positive de la vitellogénine chez des abeilles exposées à l'imidaclopride, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes (De Smet et al., 2017). De la même manière, la première étude n'a pas mis en évidence un effet sur le métabolisme énergétique (Schmehl et al., 2014), alors qu'une autre étude sur l'impact d'une exposition à l'imidaclopride a montré une régulation positive de la gluconéogenèse et de la glycolyse (Derecka et al., 2013). À l'image de ces deux cas de figure, il est important de noter qu'il existe, au sein de la littérature scientifique, une très grande variabilité concernant les effets des pesticides. L'impact dépend de la cible, la nature et la dose des pesticides, ainsi que les conditions de l'expérimentation (*in vitro* versus *in vivo*).

Les pesticides peuvent également agir sur le système immunitaire des abeilles (Garrido et al., 2013). L'exposition à des insecticides, acaricides ou fongicides réprime l'expression de gènes liés à l'immunité et réduit donc l'immunocompétence chez l'abeille (Aufauvre et al., 2014; Boncristiani et al., 2012; Di Prisco et al., 2013; Garrido et al., 2013; Gregorc et al., 2012). Cela suggère une possible immunotoxicité des pesticides. En plus d'affecter négativement la réponse immunitaire des abeilles, il a été montré qu'une exposition à un pesticide pouvait, en parallèle, favoriser la réplication de virus (Di Prisco et al., 2013).

Une grande partie des pesticides a un effet neurotoxique, avec pour conséquence la diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation des individus (Belzunces et al., 2012; Palmer et al., 2013). Ainsi, un effet au niveau cognitif va avoir un impact direct sur le comportement des individus exposés aux pesticides. Les abeilles exposées à des néonicotinoïdes échouent, par exemple, à utiliser les repères environnementaux pour rentrer dans leur colonie si elles sont préalablement placées dans un environnement non familier (Fischer et al., 2014).

Par leur large utilisation à l'échelle du paysage et la diversité de leurs effets, les pesticides représentent un risque non négligeable pour l'intégrité des individus et *in fine*, pour la pérennité des colonies.

IV.2. Pathogènes et réponses immunitaires

La présence, au sein d'une même colonie, de ressources alimentaires et de nombreux individus vivant dans un espace confiné, augmente l'attractivité des colonies pour les pathogènes et facilite la transmission de maladies (Schmid-Hempel and Schmid-Hempel, 1998). Ainsi, naturellement les abeilles sont exposées à un large éventail de pathogènes, incluant les protozoaires, champignons, bactéries, virus et acariens (Evans and Schwarz, 2011).

IV.2.1. Mécanismes généraux de défense immunitaire

Comme tous les organismes, les abeilles ont développé des mécanismes de défense individuelle pour limiter l'impact des pathogènes à travers des réponses physiologiques, immunitaires et comportementales (Evans and Spivak, 2010). Lorsque le pathogène a réussi à passer les barrières physiques de l'individu, ce dernier peut encore se défendre en modifiant par exemple son pH ou sa température. En parallèle, les abeilles sont capables de mettre en place une réponse immunitaire impliquant quatre voies de signalament et d'actions connues chez les insectes : Toll, Imd (voie de l'immunodéficiency), Jak/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) et Jnk (c-Jun N-terminal kinase)(Evans et al., 2006). Cependant, contrairement à d'autres insectes, comme les drosophiles ou les anophèles, le nombre de gènes impliqués dans ces voies sont nettement moins nombreux chez l'abeilles (Evans et al., 2006). Malgré cette apparente limitation dans la réponse immunitaire, les abeilles ne semblent pas être plus susceptibles que les autres insectes, face à la présence de pathogènes. Ainsi, en plus d'un mécanisme de défense individuelle, les abeilles ont développé des comportements de défense collective ou d'immunité sociale (Cremer et al., 2007). Ces stratégies alternatives pour lutter contre les pathogènes incluent notamment des comportements hygiéniques, consistant à percevoir et retirer de la colonie les larves et abeilles adultes infestées (Ibrahim and Spivak, 2006; Spivak and Reuter, 2001). Un autre comportement majoritairement adopté par les abeilles est l'épouillage collectif pour enlever les particules étrangères et les ectoparasites sur le corps d'un autre individu (Boecking and Spivak, 1999). Cependant, s'il a été montré que les abeilles, infectées par un virus, augmentaient le comportement d'épouillage envers les congénères (Waddington and Rothenbuhler, 1976), ceci augmente les interactions sociales et peut avoir pour conséquence d'accroître le risque épidémiologique dans la colonie (Bailey and Ball, 1991). Malgré la mise en place de toutes ces adaptations pour limiter l'impact de

pathogènes sur la colonie, un certain nombre d'individus développent tout de même des infections. Dans ce cas, un autre mécanisme pouvant également être interprété comme de l'immunité sociale va être mis en place. En effet, les abeilles infestées par des pathogènes, peuvent accélérer leur développement et commencer de manière précoce leur activité de butinage, ce qui peut contribuer à limiter le temps de contact avec les congénères sains (cf. paragraphe suivant).

IV.2.2. Conséquences

Au niveau physiologique, la microsporidie *Nosema ceranae*, pathogène obligatoire de l'intestin des abeilles, a été identifiée comme provoquant un changement dans l'expression de vitellogénine et d'hormone juvénile chez les jeunes abeilles (Alaux et al., 2014; Goblirsch et al., 2013). Cela va dans le sens d'une accélération du développement comportementale et donc d'un début d'activité de butinage précoce comme cela a été montré suite à une infection parasitaire (Downey et al., 2000; Dussaubat et al., 2013; Goblirsch et al., 2013; Janmaat and Winston, 2000). Cette évolution rapide vers un comportement de butinage peut être interprétée comme une manipulation directe du parasite pour optimiser sa dispersion, sur d'autres sites comme les fleurs ou encore via la dérive des ouvrières dans d'autres colonies voisines. Cependant cela peut également être considéré comme de l'immunité sociale car les abeilles infectées vont passer moins de temps en contact avec les jeunes individus de la colonie comme les larves, ou la reine (Cremer et al., 2007). Dans les deux cas le risque pour la colonie n'est pas négligeable. En effet, il a été montré que des abeilles engagées précocement dans des tâches de butinage étaient moins efficaces que des abeilles ayant un développement normal et que leur risque de mortalité lors de leur premier vol était plus élevé (Barron, 2015). De plus cette accélération du comportement peut, à terme, induire un déséquilibre dans le ratio nourrices/butineuses.

Au niveau cognitif, il a été montré que les abeilles parasitées par l'acararien *Varroa* (Jasna Kralj and Fuchs, 2006), infectées par le champignon intestinal *Nosema* (Kralj and Fuchs, 2010) ou par des virus comme le virus du couvain sacciforme (SBV : Bailey and Fernando, 1972) ou le virus des ailes déformées (DWV : Iqbal and Mueller, 2007), présentent des capacités d'apprentissage, d'orientation et de vol réduites. Ces abeilles risquent donc de passer plus de temps sur le terrain lors des vols de butinage (Alaux et al., 2014; Wolf et al., 2014). De plus, une infection parasitaire peut réduire les réserves nutritionnelles (Mayack and Naug, 2009). L'augmentation des besoins énergétiques, peut être due aux besoins directs du parasite pour se développer ou aux besoins de l'abeille pour lutter contre son parasite, le développement d'une réponse immunitaire étant coûteux (Ardia et al., 2012; Freitak et al., 2003).

L'ensemble de ces connaissances suggère la possibilité d'un effet très négatif sur la colonie, tant au niveau organisationnel qu'énergétique et donc *in fine* sur l'homéostasie de la colonie.

IV.3. Variations climatiques

En tant qu'insecte, la survie, la physiologie et le comportement des abeilles sont fortement influencés par la température environnementale (Johnston and Bennett, 1996). Or, à l'image de ce qui a été décrit depuis plusieurs années sur l'ensemble de la planète, la température globale en France, augmente progressivement (IPCC, 2014).

Dans un contexte de changement climatique, le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat prédit une augmentation de la température moyenne terrestre de 1 à 3,7°C d'ici la fin du siècle (IPCC, 2014). En parallèle il est prédit une augmentation, tant en fréquence qu'en intensité, des événements climatiques extrêmes comme des vagues de chaleur (Frich et al., 2002). En France, d'ici 2100 le nombre de jours de vague de chaleur en été pourrait considérablement augmenter (Figure I-5).

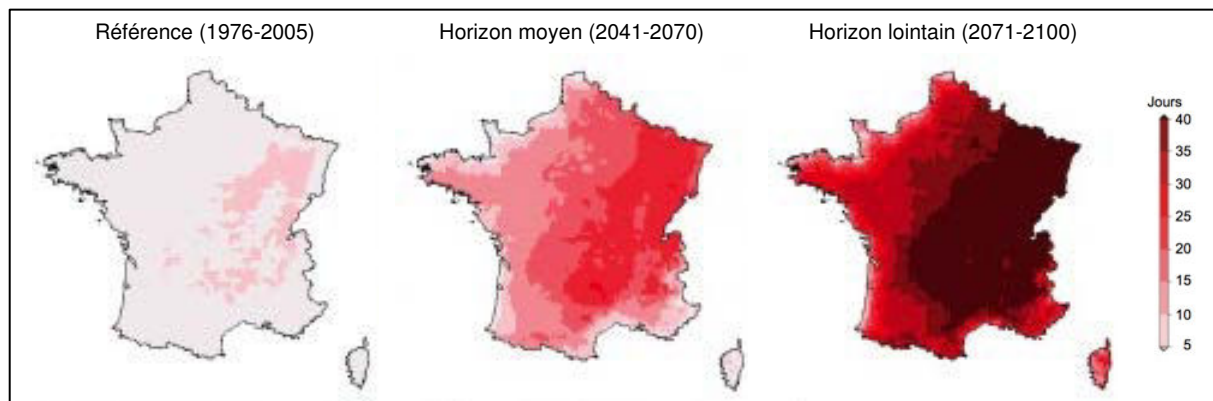


Figure I - 5. Prédiction du nombre de jours de vagues de chaleur l'été en France.

Estimation à moyen (2041-2070) ou long terme (2071-2100) du nombre de jours de vagues de chaleurs pendant la saison estivale en France, par rapport à la référence de 1976-2005. L'estimation se base sur le modèle numérique ALADIN (Aire Limitée Adaptation dynamique Développement InterNational ; ©MEDDE).

IV.3.1. La thermorégulation active : une protection contre les variations climatiques

Au sein des colonies d'abeilles, la régulation de la température est primordiale pour assurer le développement optimal du couvain. Pour cela, les abeilles ont développé des réponses comportementales afin de maintenir l'homéothermie de la colonie. Pour réchauffer le couvain, les abeilles contractent leurs muscles alaires pour augmenter leur métabolisme et ainsi produire de la chaleur (Esch, 1960). À l'inverse, pour refroidir le couvain, les abeilles ventilent l'intérieur de la ruche pour permettre l'évaporation de l'eau qu'elles ont collectée (Lindauer, 1954). Il semblerait qu'en plus de ces réponses communes aux différentes espèces d'abeilles sociales, les abeilles géantes (*Apis dorasta laboriosa*) aient développé un comportement alternatif qui consiste à faire des vols courts, de manière simultanée pour un grand nombre d'abeilles, afin de faciliter la circulation de l'air dans la colonie (Kastberger et al., 1996; Woyke et al., 2003). Malgré

des comportements similaires, la sensibilité du couvain aux variations de températures semble varier entre les espèces (Figure I-6) ce qui induit une réponse plus ou moins importante des adultes. *Apis mellifera* est l'espèce la plus sensible aux variations de températures, avec une régulation plus stricte pour assurer un développement optimal de son couvain. Comme l'activité de thermorégulation est hautement demandeuse en énergie, cette adaptation comportementale peut, à terme, engendrer un certain coût au niveau individuel et créer un déséquilibre énergétique au sein de la colonie.

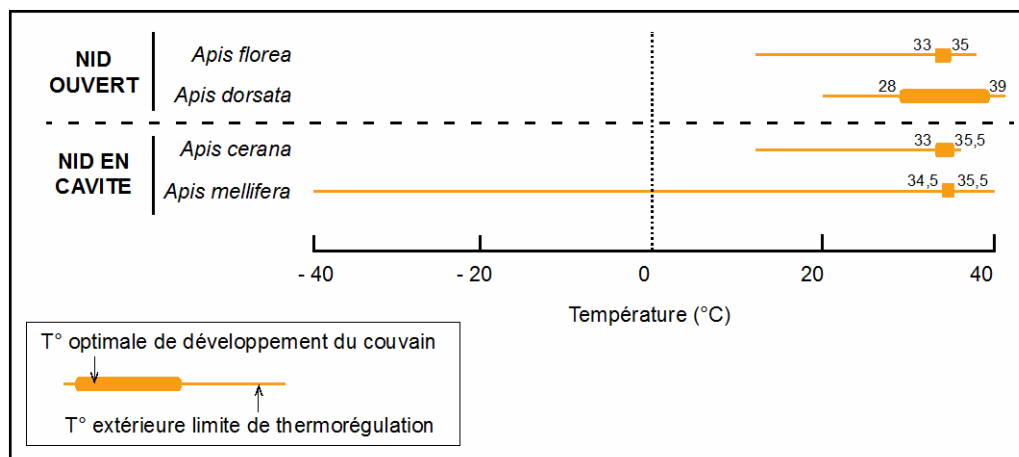


Figure I - 6. Thermorégulation du nid chez l'abeille.

Température optimale de développement du couvain (trait orange épais) et la température extérieure limite où les abeilles sont capables de thermoréguler (trait orange fin) en fonction des espèces d'abeilles et de leur type de nid (review : Oldroyd and Wongsiri, 2006).

IV.3.2. Impact sur le métabolisme

L'activité enzymatique étant thermodynamique, le métabolisme et la température sont corrélés positivement, de ce fait une augmentation de la température va nécessairement induire une accélération du métabolisme (Gillooly et al., 2001). Ainsi chez les abeilles, qui sont partiellement ectothermes, le taux métabolique de base, au repos, est positivement corrélé à la température ambiante (Kovac et al., 2007; Rothe and Nachtigall, 1989; Stabentheiner et al., 2003).

Dans un premier temps, l'accélération du métabolisme suite à une augmentation de la température devrait se faire au profit de la survie. Cependant cette réorientation du métabolisme pour la survie risque de se faire au dépend d'autres fonctions. L'apprentissage et la mémorisation sont, par exemple, des mécanismes très coûteux en énergie (Ames, 2000; Dukas, 1999; Laughlin et al., 1998). Ainsi lorsqu'une abeille est confrontée à un stress énergétique, l'investissement énergétique dans le maintien des fonctions vitales peut se faire au dépend d'autres fonctions comme les capacités cognitives (Jaumann et al., 2013). A l'échelle de la colonie cela peut avoir des conséquences sur les performances des individus.

V. Objectifs de la thèse

Comme nous venons de le voir en détail, l'abeille est soumise à de nombreux stress environnementaux auxquels elle doit répondre. Cependant, l'organisation sociale qui régit leur vie ajoute une complexité supplémentaire dans la mise en place de réponses spécifiques. En effet, avec une organisation en castes comportementales, il est raisonnable de penser que la réponse au stress va varier en fonction du rôle social des individus et que son occurrence va se faire aussi dans l'intérêt du groupe et non plus uniquement dans l'intérêt de l'individu. Cependant, pour l'heure assez peu d'études ont analysé en même temps l'effet du stress sur les différentes castes comportementales et à différents niveaux d'intégrations. Ainsi, le but principal de cette thèse est d'améliorer nos connaissances sur les modifications physiologiques, métaboliques et comportementales induites par une exposition au stress chez l'abeille.

Les objectifs généraux sont donc de :

- Déterminer la nature des réponses physiologiques au niveau individuel
- Déterminer les réponses en fonction de la caste comportementale et du type de stress
- Déterminer l'impact et les réponses au stress au niveau comportemental

*Les données sur la réponse et la sensibilité des abeilles au **niveau physiologique** sont présentées dans le **chapitre II**.*

La réponse au stress implique une mobilisation des ressources énergétiques, qui sont aussi liées à la détermination de la division du travail (Toth et al., 2005). Je me suis donc tout d'abord intéressée à l'effet de différentes sources de stress (xénobiotique, immunitaire, thermique et social) sur la mobilisation des ressources énergétiques et l'expression de gènes impliqués dans la division du travail (vitellogénine et hormone juvénile).

Différentes castes comportementales comme les nourrices (soin au couvain), gardiennes (protection de la colonie) et butineuses (collecte des ressources) vivent ensemble au sein de la colonie. Les abeilles ont des profils physiologiques caractéristiques de la tâche dans laquelle elles sont engagées, des réponses au stress spécifiques de la caste comportementale sont donc attendues. Par exemple, la tolérance aux pesticides étant dépendante du poids des individus, les abeilles plus lourdes, comme les nourrices, sont généralement moins sensibles que des abeilles plus légères (Gerig, 1975; Ladas, 1972; Nogueira-Couto et al., 1996; Tahori et al., 1969). De plus la vitellogénine, qui a un rôle de protection contre les stress oxydatifs (Seehuus et al., 2006) et dont les taux sont plus élevés chez les nourrices que chez les butineuses (Robinson, 1987), peut accroître la résistance au stress. Sur la base de ces connaissances, j'ai fait l'hypothèse que les **nourrices vont tolérer plus facilement un stress que les butineuses**. Cette hypothèse soulève donc une autre question à laquelle j'ai également cherché à répondre, à savoir : Les

butineuses qui ont une physiologie proche d'abeilles stressées sont-elles tout de même en mesure de répondre et/ou de s'adapter à un stress ? Les gardiennes ayant vraisemblablement une physiologie intermédiaire entre celle des nourrices et des butineuses, l'hypothèse d'une **tolérance dépendante de la caste comportementale** selon le pattern suivant : **butineuse < gardienne < nourrice**, peut être avancée.

En règle générale, la mobilisation des réserves énergétiques se trouve au premier rang des réponses au stress chez les organismes. Ainsi j'ai aussi émis l'hypothèse **d'une modification du métabolisme et du budget énergétique des abeilles suite à un stress**.

Enfin, étant donné la nature très diverse des stress et donc des réponses requises à l'échelle individuelle et coloniale, il est attendu que les **modifications de la physiologie et du métabolisme énergétique varient selon le type de stress**.

*Les données sur la réponse des abeilles au **niveau comportemental** sont présentées dans les **chapitre III et IV**.*

L'étape suivante est d'identifier les conséquences des modifications physiologiques et vraisemblablement du métabolisme énergétique sur le comportement des abeilles à l'échelle de la colonie. Pour cela, je me suis focalisée essentiellement sur l'activité de vol et de butinages des abeilles. Chez l'abeille domestique l'activité de butinage, essentielle au développement de la colonie, est très exigeante au niveau des capacités cognitives (Klein et al., 2017) et énergétiques. Notamment, le vol chez les insectes est connu pour être un des processus physiologiques le plus intense et le plus coûteux en énergie du règne animal (Dudley, 2000) ; l'activité métabolique durant le vol pouvant être jusqu'à 170 fois plus élevée que chez les individus au repos (Bartholomew and Casey, 1978). Les capacités cognitives étant coûteuses en énergie (Ames, 2000; Dukas, 2008; Laughlin et al., 1998), il est possible que le stress, au-delà d'impacter directement l'activité de vol en épuisant les abeilles, altère indirectement leurs performances en réduisant leurs capacités cognitives et donc d'orientation. En conséquence, nous pouvons nous attendre à ce que les **facteurs de stress environnementaux, qui s'accompagnent souvent d'une augmentation de la demande énergétique, compromettent les performances des butineuses et donc potentiellement la balance énergétique des colonies**.

L'ensemble de ce travail, par son approche multidisciplinaire vise à identifier les réponses spécifiques de chaque caste comportementale d'ouvrières au niveau physiologique mais également leurs conséquences comportementales à l'échelle de la colonie. Passer du niveau physiologique à comportemental permet d'avoir une vision globale de l'effet de stress biotiques et abiotiques sur les colonies d'abeilles, ce qui semble primordial dans le contexte actuel d'affaiblissement des colonies.

CHAPITRE II ○ ● ○ ○ ○

Réponses physiologiques selon le type de stress et la caste comportementale



I. Avant-propos

Comme nous venons de le voir en détail, les abeilles sont exposées à un nombre croissant de pressions environnementales. La multiplicité et la synergie entre les sources de stress peuvent avoir un impact sur la survie, l'intégrité physique et l'homéostasie physiologique des individus. L'abeille est un pollinisateur avec un rôle majeur dans le maintien de la biodiversité des écosystèmes et la productivité des agrosystèmes. Ainsi il apparaît primordial d'améliorer nos connaissances sur les réponses des abeilles face à ces stress, notamment au niveau physiologique (Even et al., 2012).

L'organisation sociale chez les abeilles est très avancée ce qui ajoute une complexité dans la mise en place de réponses individuelles qui vont être dépendantes à la fois, des besoins de l'individu et de ceux de la colonie. L'une des caractéristiques principales des sociétés d'abeilles c'est le polyéthisme d'âge. Ainsi les ouvrières vont au cours de leur vie effectuer plusieurs tâches, chacune associée à une physiologie bien définie. En fonction de la tâche dans laquelle les abeilles sont engagées, il est possible d'imaginer qu'elles ne vont pas répondre de la même manière à différentes sources de stress. Par exemple, quand une abeille est en charge du soin au couvain, au début de leur vie, il est possible qu'elle réagisse plus rapidement qu'une butineuse, à un stimulus impactant l'intégrité des larves et des nymphes, ce qui serait le cas lors d'un stress thermique au sein de la colonie. Mais aussi il est probable que les réponses diffèrent selon leur état physiologique initial.

Ainsi, l'objectif de cette partie est de **déterminer la nature des réponses physiologiques au stress, en fonction du type de stress et de la caste comportementale, ainsi que leurs conséquences sur l'abeille**. Pour répondre à cet objectif j'ai mené une étude pluridisciplinaire sur la physiologie associée à la division du travail, le métabolisme énergétique et le métabolome d'abeilles exposées à un stress xénobiotique, immunitaire, thermique ou social.

Sur la base des éléments développés précédemment, 2 hypothèses émergent :

- Au vu des différences physiologiques, la réponse au stress va dépendre de la caste comportementale
- Les stress étant de nature différente, la réponse mise en place par les abeilles, au niveau du métabolisme va dépendre du type de stress

II. Impacts de stress biotiques ou abiotiques sur la physiologie des adultes

II.1. Réponse au stress au niveau physiologique et énergétique

Stress response in honeybees is associated with changes in task-related physiology and energetic metabolism (Article 1)

Célia Bordier, Séverine Suchail, Maryline Pioz,
Jean Marc Devaud, Claude Collet, Mercedes Charreton,
Yves Le Conte & Cédric Alaux



Journal of Insect Physiology, 2017, 98 : 47-54

In a rapidly changing environment, honeybee colonies are increasingly exposed to diverse sources of stress (e.g., new parasites, pesticides, climate warming), which represent a challenge to individual and social homeostasis. However, bee physiological responses to stress remain poorly understood. We therefore exposed bees specialised in different tasks (nurses, guards and foragers) to ancient (immune and heat stress) or historically more recent sources of stress (pesticides), and we determined changes in the expression of genes linked to behavioural maturation (vitellogenin - *vg* and juvenile hormone esterase - *jhe*) as well as in energetic metabolism (glycogen level, expression level of the receptor to the adipokinetic hormone - *akhr*, and endothermic performance). While acute exposure to sublethal doses of two pesticides did not affect *vg* and *jhe* expression, immune and heat challenges caused a decrease and increase in both genes, respectively, suggesting that bees had responded to ecologically relevant stressors. Since *vg* and *jhe* are expressed to a higher level in nurses than in foragers, it is reasonable to assume that an immune challenge stimulated behavioural maturation to decrease potential contamination risk and that a heat challenge promoted a nurse profile for brood thermoregulation. All behavioural castes responded in the same way. Though endothermic performances did not change upon stress exposure, the *akhr* level dropped in immune and heat-challenged individuals. Similarly, the abdomen glycogen level tended to decline in immune-challenged bees. Altogether, these results suggest that bee responses are stress specific and adaptive but that they tend to entail a reduction of energetic metabolism that needs to be studied on a longer timescale.

Organisms have developed physiological mechanisms allowing them to avoid or cope with adverse environmental pressures (Chrousos and Gold, 1992; Johnson and White, 2009; Stratakis and Chrousos, 1995). Still, in a rapidly evolving environment under the influence of human activity, organisms encounter increasingly diverse sources of stress (e.g., heat, parasite and toxicant exposure) with an increasing frequency. Such phenomena are likely the source of the decline of several wild bee populations (Potts et al., 2010) as well as honeybee colony losses (Goulson et al., 2015).

Given their vital importance to the maintenance of biodiversity and crop production, there is a need to improve our knowledge of the physiological processes involved in the stress response of honeybees (Even et al., 2012). The response to a stress, defined as a challenge to homeostasis, was conceptualised decades ago under the paradigm of the general adaptation syndrome (GAS;

Selye, 1950). According to this paradigm, the dynamics of stress responses include an alarm phase, during which the organism is sensing the stress, and an adaptation phase, corresponding to the production of a cascade of behavioural and/or physiological responses. If the stress persists, then an exhaustion phase ensues, in which the organism is unable to maintain normal functions and succumbs to the stress.

However, the social lifestyle of honeybees introduces an additional level of complexity to stress adaptation. During their lifetimes, worker bees undergo a succession of behavioural states, starting as nurse bees performing in-hive activities (e.g., brood care and feeding), and ending as forager bees dedicated to field activity (i.e., pollen and nectar collection). Such a division of labour enables the colony to function as a coherent social unit for its provisioning, growth and reproduction. It is therefore expected that the GAS will occur in the interest of the social group to maintain the social homeostasis and not just in the interest of individual bees. This expectation was highlighted by several studies that showed that colony disturbance, parasite infection and starvation induce an increase in juvenile hormone (JH) production and lead to precocious foraging (Amdam et al., 2004a; Goblirsch et al., 2013; Harris and Woodring, 1992; Schulz et al., 1998). The early departure from the hive has been proposed to be an adaptive response at the group level as it enables a reduction in disease transmission via social contacts in the case of parasite infection or an increase in food collection when the colony is starving. In addition, exposure to stress in insects is often followed by a mobilisation of energy reserves to cope with an increase in the metabolic demand (Even et al., 2012; Johnson and White, 2009). Nonetheless, the transition from nursing to foraging in bees is associated with a number of physiological changes, including a persistent loss of half of the abdominal lipid stores (Ament et al., 2010; Toth and Robinson, 2005; Toth et al., 2005). Therefore, the stress response may also vary depending on the behavioural state of the bees.

Interestingly, JH signalling and energy mobilisation, which are involved in the regulation of behavioural development in honeybees (Nelson et al., 2007; Sullivan et al., 2000), are also parts of the physiological stress responses in different insect species (Amdam, 2011; Johnson and White, 2009). This association clearly suggests a tight link between individual stress response and behavioural maturation. An increase in the proportion of colony members dedicated to foraging in response to adverse environmental stimuli, combined with the higher risk of death of precocious foragers, has been hypothesised to explain colony decline (Amdam, 2011; Perry et al., 2015). However, to our knowledge, no systematic comparison of the stress response to a variety of stressors or between different behavioural castes has been performed. It therefore remains unclear whether the changes affecting physiological pathways regulating behavioural

maturation are a general stress response or are specific to the type of stress and/or the behavioural caste. In particular, such changes might be elicited by ecologically relevant stressors but might not have been selected for more recent challenges, such as pesticides. In addition, foragers already display many features of stressed animals, i.e., high JH levels (Amdam, 2011), a higher susceptibility to starvation (Toth and Robinson, 2005) and oxidative stress (Seehuus et al., 2006). It is therefore not clear whether honeybees are still able to respond to adverse stimuli. Such information would facilitate our understanding of how honeybees respond to stressors and the potential impact at the colony level.

To answer these questions, we exposed bees belonging to different behavioural castes to diverse acute, sub-lethal (i.e., not leading to exhaustion) challenges frequently encountered by bees (Goulson et al., 2015). We then determined whether some physiological parameters linked to behavioural maturation and energy metabolism were affected. We exposed nurse, guard and forager bees to two pesticides with different modes of action (phenylpyrazole fipronil or pyrethroid deltamethrin), heat or an immune challenge triggered by physical wounding. First, we measured the gene expression levels of juvenile hormone esterase (*jhe*), which is involved in JH degradation (Mackert et al., 2008), and vitellogenin (*vg*). Vitellogenin plays a key role in the regulation of behavioural maturation, with a higher expression in nurses than in foragers (Amdam, 2011), but it also promotes bee longevity because of its protective role against oxidative stress (Seehuus et al., 2006). Second, we assessed energy mobilisation by determining the levels of glycogen, the main source of energy for flight (Neukirch, 1982), and the gene expression level of the adipokinetic hormone receptor (*akhr*). AKH is involved in glycogen and lipid mobilisation from the fat body (Kodrík, 2008) and likely acts as a stress hormone in insects (Johnson and White, 2009). In honeybees, the role of AKH in energy mobilisation has been questioned by several studies suggesting a loss of this function (Lorenz et al., 1999; Mayack et al., 2015; Veenstra et al., 2012; Woodring et al., 2003). Yet, two recent studies suggested that AKH pathway may be active in bees (Ament et al., 2011) and might rather be exclusively associated with carbohydrate mobilisation (Wang et al., 2012). Finally, the basal metabolic rate of stressed bees was estimated based on their endothermic performances.

MATERIALS AND METHODS

Experimental setup

Experiments were conducted in 2014 and 2015 with honeybees typically used in the southeast of France for beekeeping (predominantly *Apis mellifera mellifera*). The stress response was assessed according to task specialisation (nurse, guard and forager) and type of stress (pesticides, immune challenge and heat).

Nurses were identified by carefully removing brood combs from colonies and detecting bees that dipped their heads into several cells containing larvae. Guards were identified by scanning the hive entrance and detecting individuals who were controlling bees returning to the colony. Only approximately 15 % of the bees in a colony will ever perform guarding tasks (Moore et al., 1987), and the propensity to guard is under genetic determination (Robinson and Page, 1988), suggesting distinct physiological predispositions. Closing the hive entrance and detecting bees returning to the colony with pollen loads allowed for the identification of foragers, therefore discarding bees performing orientation and cleaning flights.

Nurses, guards and foragers were immediately placed in different plastic cages (10.5 x 7.5 x 11.5 cm) containing candy (Api Fonda, Mannheim, France) and brought back to the lab and paint-marked on the thorax (Posca Posta pens, Japan). We then introduced 5 nurses, guards or foragers into new plastic cages with 15 nestmates randomly collected on brood combs from the same colony. They were placed in an incubator (30°C and 50-70 % humidity) and supplied with *ad libitum* candy and water. Paint-marked control and stressed bees were sampled 24 or 96 h after the beginning of treatments (see below) to assess the stress-induced physiological changes. Experiments were replicated twice per colony and repeated on 3 colonies to obtain a global response and minimise a potential colony-specific response.

Stress exposure

Pesticides

We tested two pesticides that are commonly used for pest control, that are frequently detected in colonies, and that belong to two different chemical families: fipronil and deltamethrin (Chauzat et al., 2006; Choudhary and Sharma, 2008; Johnson et al., 2010). Fipronil is a phenylpyrazole insecticide with a rather low median lethal dose (LD₅₀) (Carvalho et al., 2013: 5.83 ng/bee), and deltamethrin is a pyrethroid insecticide with a higher LD₅₀ (Carvalho et al., 2013: 50.65 ng/bee).

Both pesticides were dissolved in acetone (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for topical application on the thorax. For each, three conditions were tested, control (acetone only) and two sublethal doses (1/50 and 1/10 of LD₅₀), which were prepared before each experiment

by cascade dilution from an aliquot of the stock solution (2 g/L) stored at -20°C. Thus, we used 0.1 or 0.5 ng/bee of fipronil and 1 or 5 ng/bee of deltamethrin (standard analytic, purity 97.5 %, Pestamal® Sigma-Aldrich, respectively). Preliminary experiments demonstrated that such doses are sublethal (data not shown).

Bees were anaesthetised with carbon dioxide for 40 seconds and kept immobilised on ice while 1 µL of either solution was applied onto their thorax with a Hamilton syringe mounted in a repeated dispenser.

Immune challenge

The bee immune system was experimentally activated thanks to a pin prick between the third and fourth tergites with a 0.15-mm needle. Several studies demonstrated that such mechanical wounding elicits an immune response in bees (Alaux et al., 2014; Evans et al., 2006; Siede et al., 2012). The pin prick was performed on the side to avoid damaging the dorsal vessel, but if a haemolymph drop was released, then the bee was discarded. Control bees were handled but did not receive any pin prick.

Heat challenge

Heat stress was induced by exposing bees to a temperature of 37°C in an incubator. This temperature, within a range frequently encountered during summer in the southeast of France, is 3 degrees above the optimal temperature for brood development (Crailsheim et al., 2013) and likely stressful for bees within the hive. Control bees were kept at 30°C.

Physiological measures

Gene expression analysis

We assessed the impact of stress on the expression level of *vg*, *jhe* and *akhr*. Bees were sampled 24 h after the beginning of stress exposure. They were anaesthetised with CO₂ and immediately flash frozen in liquid nitrogen and were then stored at -80°C. Total RNA was extracted from individual abdomens, which were homogenised in 900 µL of Qiazol reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) with a Tissue Lyser (Qiagen) (4 x 30 s at 30 Hz). RNA extraction was then carried out as indicated in the RNeasyPlus Universal kit (Qiagen) with DNase treatment. RNA yields were measured with a Nanodrop (Thermo Scientific, Illkirch, France), and cDNA synthesis, starting from 1 microgram of RNA, was performed with the High capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems®, Saint Aubin, France). cDNA samples were diluted ten-fold, and the expression levels of genes were assessed using StepOne-Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®) and the SYBR green detection method, including the ROX passive

reference dye. Three μL of cDNA were mixed with 5 μL SYBR Green Master Mix, 1 μL of forward primer (10 μmol) and 1 μL of reverse primer (10 μmol) of the target genes. A dissociation stage for the subsequent melting curve analysis was included. The cycle threshold values of *vg*, *jhe* and *akhr* were normalised to the geometric mean of the housekeeping genes *actin* and *eIF-S8* using the comparative quantification method (delta Ct method). We used the published sequences of primers for *vg* (Fischer and Grozinger, 2008), *jhe* and *akhr* (Ament et al., 2011) and for housekeeping genes *actin* (Amdam et al., 2004b) and *eIF-S8* (Ament et al., 2011). The final sample size was 18 bees per treatment and behavioural caste.

Endothermic performance

To record the body temperatures of bees, we used a thermal infrared camera FLIR S65 (320 x 240 pixels, thermal sensitivity <0.1 °C, FLIR®, Boston, USA) and ThermaCAM Researcher 2.10 Pro software (FLIR®). Aluminium, placed in the same setup as the bees, was used to calibrate the emissivity and temperature recorded by the thermal infrared camera.

Measures were performed on bees 24 and 96 h after the beginning of the stress treatment. For each treatment condition (control, immune challenge or heat stress) and replicate, nurses, guards and foragers were analysed at the same time. To facilitate monitoring and exclude any heat production related to bee locomotor activity, bees were individually immobilised in piston tubes (100-mL syringes, BD Plastipak™, Le Pont de Claix, France) closed with a transparent plastic film. For each bee, the thermography data of the abdomen and thorax were recorded via a video of 5 min at a rate of 1 picture per 10 s and stored digitally with 14-bit resolution (Figure II-1). The temperature difference between the thorax and abdomen was used to determine endothermic performance (Stabentheiner et al., 2010). The final sample size ranged from 5 to 18 bees per treatment, behavioural caste and timing.

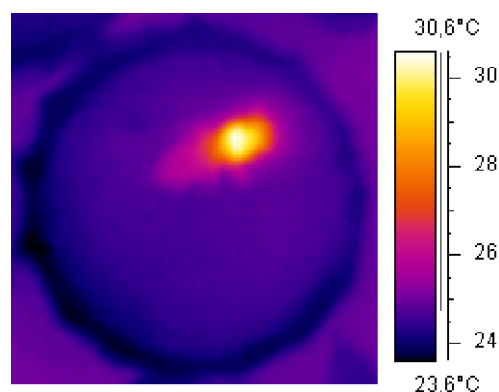


Figure II - 1. Thermogram of a honeybee.

The false colour scale indicated the temperature measures performed on an individual bee immobilised in a plastic syringe under the camera. Thoracic and abdominal temperatures were recorded separately to calculate the endothermic performance. Here, $T_{\text{thorax}} = 32.0^{\circ}\text{C}$, and $T_{\text{abdomen}} = 27.4^{\circ}\text{C}$, giving an endothermic performance of 4.6°C .

Glycogen quantification

Glycogen was quantified 96 h after the beginning of stress treatment. Bees were stored at -20°C until analysis. For each individual, glycogen was quantified separately in the abdomen and in the rest of the body. Each body part was individually weighed and crushed on ice using an automatic homogeniser in 10 % (w/v) ultrahigh quality water. To remove proteins, 4 % trichloroacetic acid (v/v) was added to the solution, which was centrifuged at 3,000 g for 1 min at 4°C. The supernatant was then precipitated by adding 2 volumes of 95 % ethanol and centrifuged again. The dry pellet was re-suspended in 450 µL of sodium acetate buffer (0.2 M, pH 5.2). Glycogen was hydrolysed by incubating (2 h at 60°C) with 7 UI/mg amyloglucosidase (EC 3.2.1.3; Sigma-Aldrich) according to Parrou and François (1997). After incubation, the solution was cooled on ice for 5 minutes, and the amount of glucose generated from glycogen was determined using the Glucose RTU™ method (BioMérieux SA, Craaponne, France) adapted to a 96-well microplate format: in each well, 25 µL of sample was incubated with 250 µL of RTU™ for 20 min at room temperature. The absorbance was determined at 505 nm. The amount of glucose was calculated from a standard curve containing pure glucose as a standard treated within the same conditions. All assays were run in triplicate. The final sample size was 18 bees per treatment, behavioural caste and time point.

Statistics

All statistics were run using statistical software R version 3.0.2 (R Development Core Team., 2013). The effect of treatment on the survival rate was analysed using a Chi² test. In order to account for pseudo-replication, gene expression, endothermic performance and stored glycogen were analysed using a repeated measures ANOVA followed by post-hoc comparison applying the Holm correction with the 'lsmeans' function (R lsmeans package; Lenth, 2016). The behavioural caste, treatment and time points (only for endothermic performance) were analysed as fixed factors while the sampling day and colony were analysed as random factors.

RESULTS

Stress effect on survival rate

All stress exposures were sublethal over 24 h since the survival rates did not differ between stress-exposed and control bees, regardless of the task specialisation (Chi² tests, all P > 0.21). The survival rates ranged from 83 to 100 % (n total= 900 bees).

Stress effect on behavioural maturation-related physiology

We first quantified the expression levels of vitellogenin and juvenile hormone esterase genes (Figure II-2). Based on such measurements, we checked whether bees specialised in nursing, guarding and foraging tasks exhibited different physiological backgrounds and whether we correctly sampled each behavioural caste. Each year (2014: immune challenge, Figure II-2A; 2015: heat challenge, Figure II-2B), we consistently found significant differences in the expression levels of *vg* and *jhe* between the untreated bees of all three castes (ANOVA, $P < 0.001$, for both genes and years). Nurses had higher levels of *vg* and *jhe* than did foragers ($P < 0.001$, for both genes and years); guards had intermediate levels of *vg* between nurses (significantly different only in 2014; $P < 0.001$) and foragers ($P < 0.045$, both years). Guards also had intermediate levels of *jhe*, between the values for nurses ($P < 0.024$, both years) and foragers (significantly different only in 2015; $P = 0.022$).

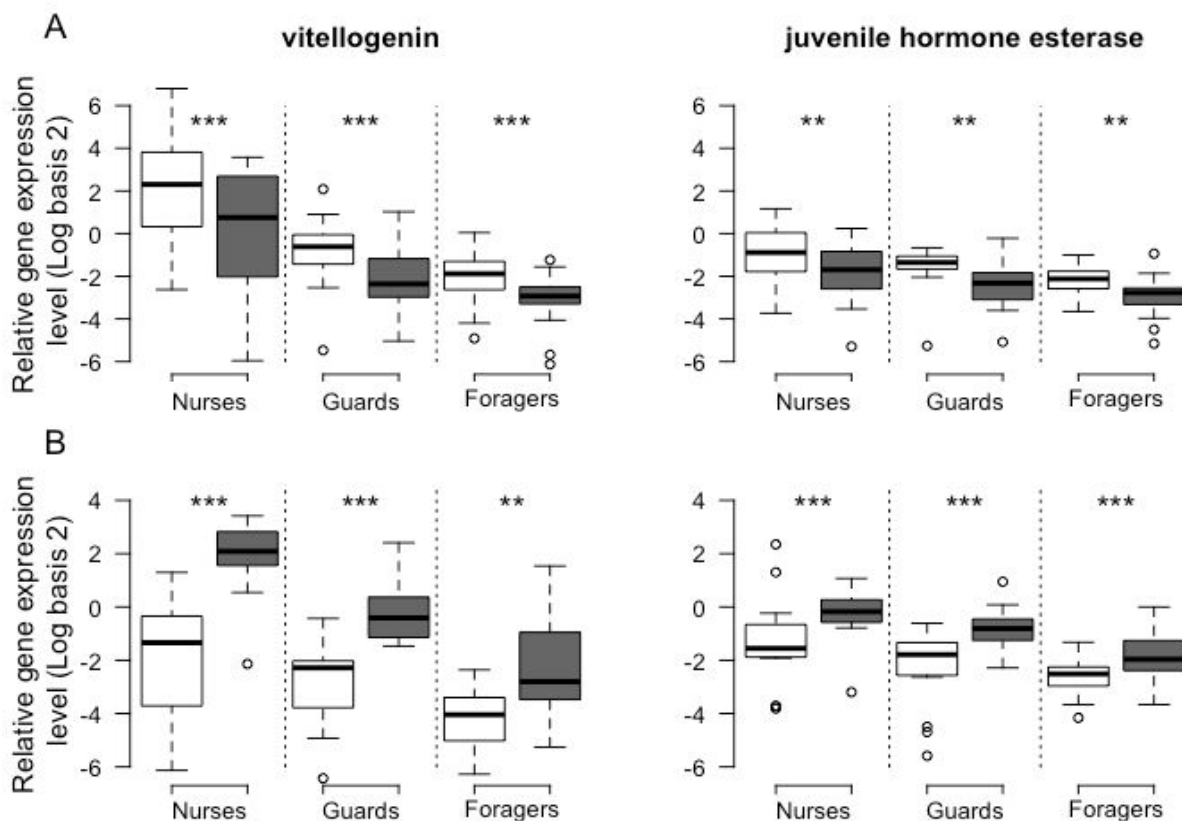


Figure II - 2. Gene expression levels of vitellogenin and juvenile hormone esterase in response to stress in different behavioural castes

Relative gene expression levels are shown, in response to immune (A) and heat challenges (B) and according to task specialisation ($n = 18$ bees per group). Experiments on immune and heat challenge were performed in 2014 and 2015, respectively. Significant differences between stressed (black boxes) and control (white boxes) bees are indicated (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$, ANOVA followed by post-hoc comparisons with Holm correction). Boxes show 1st and 3rd interquartile range with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle.

We then tested whether stress exposure modified the expression level of two behavioural maturation-related genes. Figure II-3 shows the stronger response of bees to immune and heat challenges compared to pesticide exposures. Indeed, immune and heat stress significantly affected the expression levels of *vg* and *jhe* (Figures II-2A and B). More specifically, *vg* and *jhe* levels decreased in immune-stressed bees (*vg*: $P < 0.001$; *jhe*: $P < 0.002$) but increased in bees exposed to heat (*vg*: $P < 0.002$; *jhe*: $P < 0.001$). This was true regardless of the task specialisation (Figure II-2).

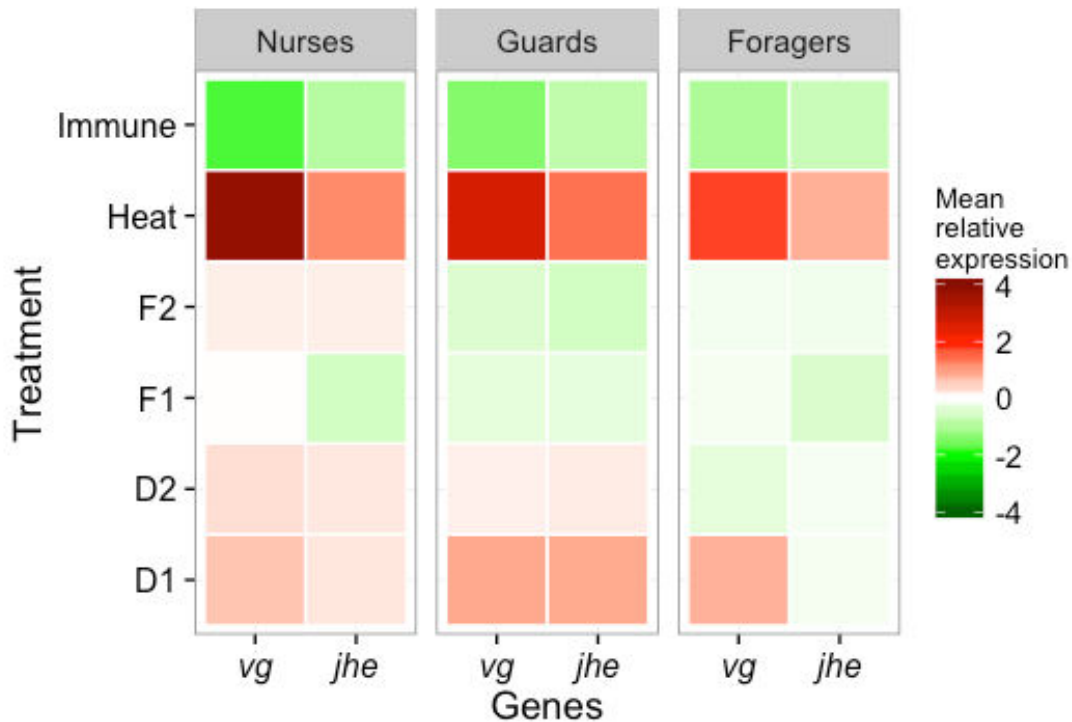


Figure II - 3. Heatmaps of vitellogenin and juvenile hormone esterase expression levels from bees exposed to different stress.

Each colour-coded square represents the mean expression levels of either vitellogenin (*vg*) or juvenile hormone esterase (*jhe*) genes in stressed bees, relative to controls ($n = 18$ bees/group). A decrease and an increase in the *vg* and *jhe* gene expression levels were observed in response to an immune and a heat challenge, respectively (see Figure II-2), while pesticides showed no clear effect. D1: Deltamethrin 1 ng/bee; D2: Deltamethrin 5 ng/bee; F1: Fipronil 0.1 ng/bee; F2: Fipronil 0.5 ng/bee.

Regarding pesticide exposure, we first verified that the solvent acetone did not influence *vg* and *jhe* expression levels (control vs. acetone-treated bees: $P > 0.28$ for both genes and all behavioural castes). Hence, this allowed us to use acetone-treated bees as controls for pesticide treatment. Exposure to pesticides did not alter the expression of these two behavioural maturation-related genes. Regardless of task specialisation, the expression levels of *vg* and *jhe* remained unaltered following exposure to either deltamethrin (*vg*: $P > 0.19$; *jhe*: $P > 0.42$) or fipronil (*vg*: $P > 0.88$; *jhe*: $P > 0.13$) (Figure II-4). Therefore, only the effects of immune and heat challenges on bee metabolism were assessed.

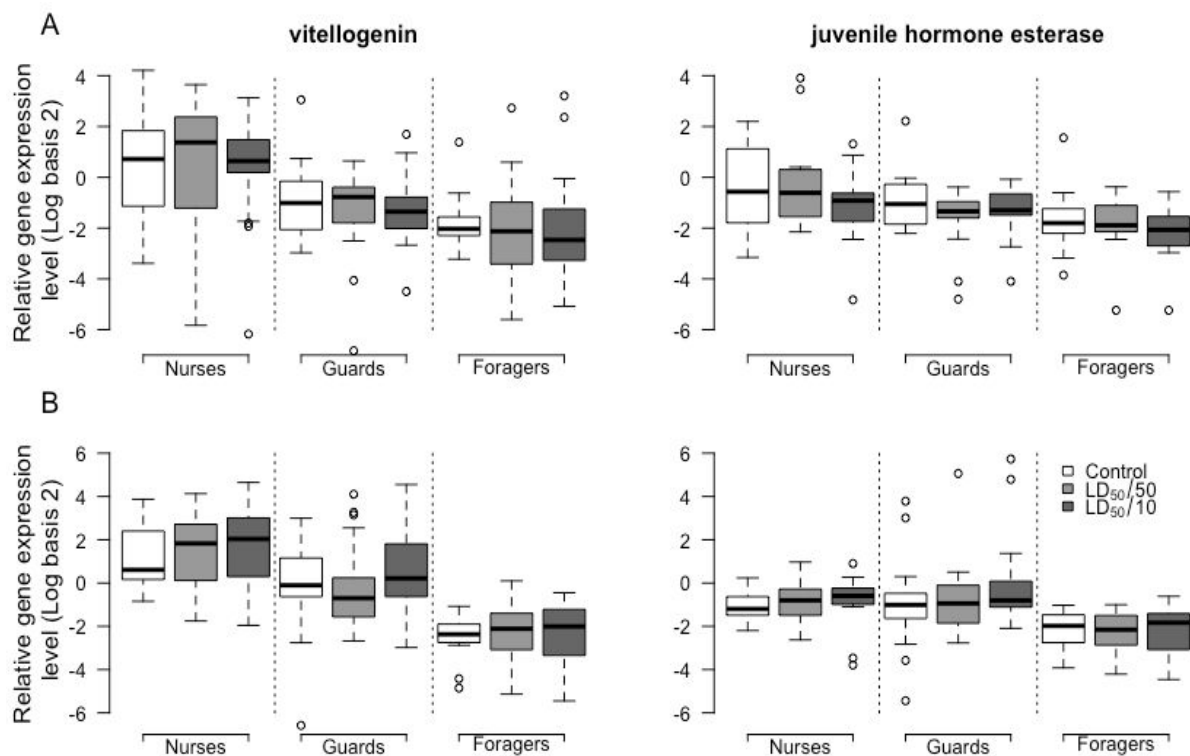


Figure II - 4. Gene expression levels of vitellogenin and juvenil hormone esterase following pesticide exposure in different behavioural castes.

Relative expression levels are shown, for the different castes and following exposure to two doses of either (A) fipronil or (B) deltamethrin ($n = 18$ bees/group). Controls were treated with acetone only; Fipronil: $LD_{50}/50 = 0.1$ ng/bee; $LD_{50}/10 = 0.5$ ng/bee; Deltamethrin: $LD_{50}/50 = 1$ ng/bee; $LD_{50}/10 = 5$ ng/bee. The *vg* and *jhe* expression levels were not affected by pesticide exposure. Boxes show 1st and 3rd interquartile range, with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle.

Stress effect on metabolism

Endothermic performance

The endothermic performance did not differ according to task specialisation ($P > 0.31$; Figure II—5). In addition, it remained unchanged following immune or heat challenges ($P > 0.20$). However, the endothermic performance of bees decreased over time (24 vs 96 h: $P = 0.033$), regardless of whether bees were exposed to a stress.

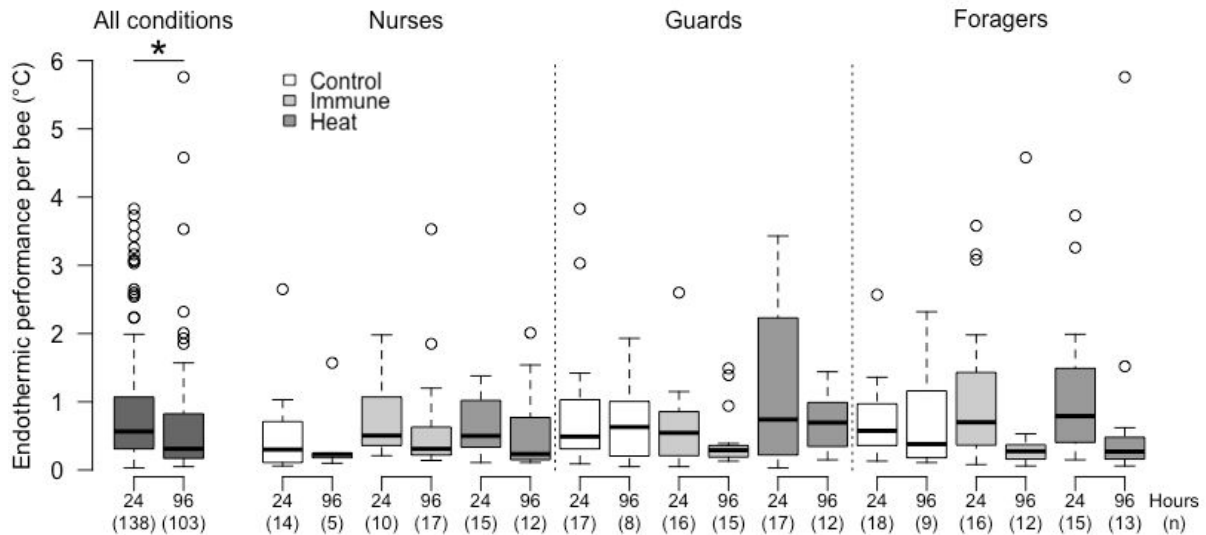


Figure II - 5. Endothermic performance of bees as a function of stress and task specialisation. Endothermic performance (°C) is shown for bees at 24 and 96 hours after the beginning of stress exposure (sample sizes are indicated in parentheses). Endothermic performance did not change according to task specialisation ($P = 0.31$) or stress exposure ($P = 0.20$) but decreased over time (*: $P = 0.033$). Boxes show 1st and 3rd interquartile range, with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle.

Glycogen level

The glycogen levels in the head/thorax did not change according to task specialisation or stress exposure ($P = 0.55$ and $P = 0.91$, respectively; Figure II-6A). Similarly, the abdomen glycogen level did not differ between behavioural castes ($P = 0.14$; Figure II-6B) but significantly decreased upon stress exposure ($P = 0.034$). When looking at each stressor separately, the stress effect disappeared, likely due to the smaller sample size. If the heat challenge did not affect abdomen glycogen levels ($P = 0.81$), the comparison between immune stress and control showed a p-value closed to the significance level ($P = 0.055$).

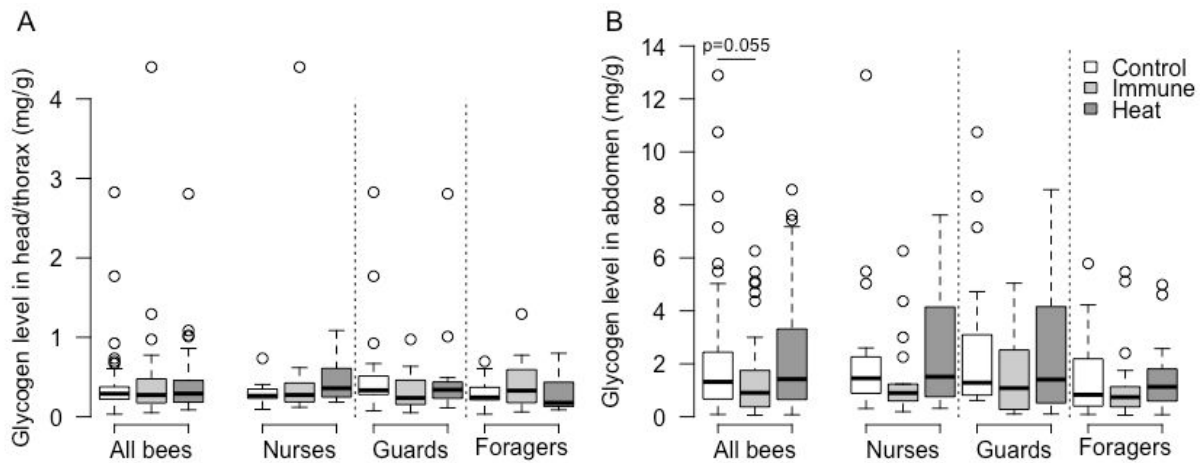


Figure II - 6. Head/thorax and abdomen glycogen levels according to stress and task specialisation.

Relative amounts of stored glycogen in head/thorax (A) and abdomens (B) are displayed for stressed and control bees belonging to different behavioural castes (n = 18 bees per group). Head/thorax glycogen levels remained stable (P = 0.91), but abdomen levels significantly decreased upon stress exposure (overall P = 0.034; immune challenge: P = 0.055; heat challenge: P = 0.81). Boxes show 1st and 3rd interquartile range, with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle.

Gene expression level of the adipokinetic hormone receptor

A significant effect of behavioural caste on *akhr* gene level was found in the heat experiment (P = 0.004) but not in the immune experiment (P = 0.13). Most importantly, immune and heat challenges both induced a significant drop in the expression level of *akhr* (P = 0.010 and P = 0.013, respectively; Figures II-7A and B). No significant difference between control and stressed bees within the same behavioural caste could be found (P > 0.14).

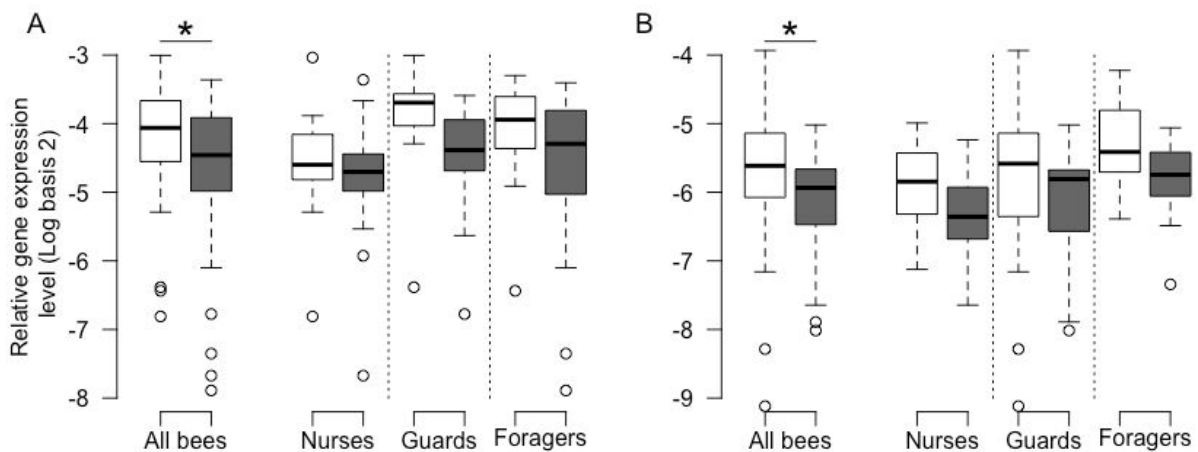


Figure II - 7. Gene expression levels of the adipokinetic hormone receptor in response to stress in different behavioural castes.

Relative gene expression levels are shown, in response to immune (A) and heat (B) challenges, and according to task specialisation (n = 18 bees per group). Expression level of *akhr* decreased upon immune and heat challenges (P = 0.010 and P = 0.013, respectively). Significant differences between stressed (black boxes) and control (white boxes) are denoted by the sign *. Boxes show 1st and 3rd interquartile range, with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle.

DISCUSSION

With the growing impact of human activities on the environment, diverse and frequent sources of stress have been recently added to the environmental pressures encountered by honeybees during their evolution. Here, we showed that honeybees have developed quick responses to ecologically relevant stressors (heat and immune challenge), which may represent physiological adaptations. However, such stress-induced changes related to division of labour tended to entail a reduction of energetic metabolism. Conversely, when submitted to recently appearing chemical stressors such as fipronil and deltamethrin, we found no activation of such responses in our conditions (at the chosen doses and time points).

Bees exhibited a clear response to an immune or heat challenge, as shown by the respective decrease and increase in both *vg* and *jhe* gene expression levels. Since both genes are involved in the regulation of task specialisation, with a low gene expression in foragers (Robinson, 1987), it seems that immune-challenged bees tend to express a more forager-like profile, while heated bees tend to express a nurse-like profile. Contrary to our finding, Salmela et al. (2016) described an increase of *vg* expression level 18 h after a needle prick in bees that had been cold anaesthetized beforehand. However, our study confirmed the results of Alaux et al. (2014) who found a decrease in *vg* expression 8 days after a needle prick in colony-reared bees. Our results were consistent in each behavioural caste and support the idea that bees display responses to adverse stimuli that are adaptive at the colony level. On the one hand, an early shift to foraging tasks of immune-challenged bees is believed to reflect a social response: by minimising in-hive contacts between infected workers and extremely important nestmates such as larvae and the queen, this shift likely reduces the risk of disease transmission within the colony (Cremer et al., 2007; Wilson-Rich et al., 2009). On the other hand, while adult bees are rather eurytherm (i.e., can support a wide range of temperatures), the brood is stenotherm (i.e., only able to survive and develop within a narrow temperature range: 33-36°C) (Seeley, 1985) and is therefore strongly dependent on nest thermoregulation. Thus, exposure to 37°C likely stimulates the bees to perform thermoregulation. In such a situation, foragers might be recruited for fanning, and this behavioural shift might be accompanied by physiological changes leading to a more nurse-like profile following the heat stress.

It is also of note that the amplitude and robustness of responses were stronger to heat stress than to the immune challenge. This may simply reflect a lower intensity of the immune challenge since the bees were not directly exposed to pathogens. However, other than the thermoregulation hypothesis, we cannot exclude a protective response against heat and the consecutive increase in oxidative damage (Ju et al., 2014; Lopez-Martinez et al., 2008) via the

production of antioxidants such as Vg (Seehuus et al., 2006). Indeed, *vg* levels increased, although bees were not in presence of the brood and needed to thermoregulate.

Since the division of labour is tightly regulated through complex physiological, hormonal and neuronal changes (Robinson, 1992), task specialisation is associated with different degrees of reactivity and/or resistance to different stresses (e.g., oxidative, immune, starvation) (Even et al., 2012; Münch et al., 2008; Speth et al., 2015). Nevertheless, physiological stress responses as measured by *vg* and *jhe* expression levels did not change according to task specialisation; rather, all behavioural castes showed a similar trend of response to a given stress. Heat challenge led to increased gene expression levels that reached significance in nurse bees, while decreased gene expression followed the immune challenge, including foragers. This result suggests that, despite variability in basal expression levels, bees of all behavioural castes maintain their ability to respond, even if they already exhibit the behavioural profile adapted to the response (forager and nurse for the immune and heat challenges, respectively). Yet, this situation is not inconsistent with possible differences in sensitivity to the stressors used here; to test this would require exposing bees to different stress intensities and determining whether response thresholds differ.

While Vg and JHE regulation is likely to be part of an adapted response resulting from natural selection (Münch et al, 2008; Amdam, 2011), we explored the possibility that it might be used by bees to respond to pesticides, which are much more evolutionarily recent stressors. It is already well known that sublethal doses of fipronil and deltamethrin have detrimental effects on individual honeybees, as shown by evidence of impaired learning and memory processes (Aliouane et al., 2009; Decourtye et al., 2005; Vandame et al., 1995). However, whether they can affect task specialisation, the possible consequences of colony demography remain to be investigated. In our study, honeybees acutely exposed to either pesticide did not respond at the molecular level (regardless of dose exposure). However, the induction of precocious foraging of intoxicated bees through increased *vg/jhe* expression levels might have been an adapted response at the colony level, as it would place a limit on pesticide propagation within the hive, as for a pathogen. Still, such a response might be observed following chronic exposure, but in such conditions the reported effects are contradictory. At the molecular level, the neonicotinoid imidacloprid either promotes (Christen et al., 2016) or inhibits (Abbo et al., 2016) *vg* expression. At the behavioural level, MacKenzie and Winston (1989a, 1989b) found no impact, or inconsistent ones, of exposure to several pesticides on the age of first foraging flights. Thus, no clear conclusion emerges from these studies. It remains possible that the effects are pesticide and/or time-specific, but a more likely explanation is that bees have not been confronted with

these new stressors for enough time to evolve adapted responses such as those triggered by ecologically-relevant stressors.

According to the GAS paradigm (Selye, 1950), the mobilisation of energy reserves plays an important role in the acute stress response, including in insects (Even et al., 2012; Johnson and White, 2009). Thus, we assessed potential changes in several indicators of bee metabolism upon stress exposure, notably the levels of glycogen, the main glucose storage form. The glycogen level in the head/thorax was not affected by stress exposure. Similarly, endothermic performance (the result of heat production by flight muscles in the thorax) did not differ between bees exposed or not exposed to a stress, even though it declined over time. Altogether, these results suggest that if there is a mobilisation of energy reserves upon stress exposure, it does not occur at the thorax level. This may be because bees have limited amounts of glycogen in their flight muscles (Neukirch, 1982; Panzenböck and Crailsheim, 1997). However, stress treatments significantly altered the glycogen level in the bee abdomen, likely due to immune challenge ($P = 0.055$). This result could be explained by the fact that mounting an immune response often implies a direct cost, as evidenced by a rise of up to 28 % of the metabolic rate in different insect species (Ardia et al., 2012; Freitag et al., 2003) and the abdomen being a central place for immune response (Buchon et al., 2014). However, heat challenge did not modify the abdomen glycogen level. It is possible that heated bees underwent rapid changes that would have gone undetected if the initial glycogen levels had been recovered by the time we performed measurements (96 h post-exposure). Another possibility is that the bees did not use this storage form to face stress exposure. Indeed, they might instead rely on gut and haemolymph carbohydrate supplies when facing a rapid energy-increasing demand (Blatt and Roces, 2001).

In addition, metabolic activity can be regulated by increasing energy catabolism under the control of the AKH neuropeptide (Arrese and Soulages, 2010), and this is likely to be involved in a general stress response in insects (Even et al., 2012). If the role of AKH in the regulation of glycogen and lipid mobilisation seems less obvious in honeybees (Lorenz et al., 1999; Mayack et al., 2015; Veenstra et al., 2012; Woodring et al., 2003), interestingly, our results show a significant downregulation of the *akhr* expression upon both stress exposures (immune and heat). Such *akhr* down regulation might reflect a decrease in carbohydrate mobilisation in stressed bees. Indeed, Wang et al (2012) observed an increase of *akhr* expression in response to a double knockdown of the genes encoding for vitellogenin and for a putative JH receptor (ultraspiracle). The double knockdown phenotype was notably associated to an elevated starvation susceptibility and haemolymph carbohydrate levels, but not to changes in fat body lipid stores. Furthermore, Wang et al (2012) suggested that fat body *akhr* expression could be

regulated by the Vg/JH module. However in our study, while *akhr* levels decreased upon immune stress, like those of *vg* and *jhe*, it also decreased significantly upon heat challenge, contrary to *vg* and *jhe*. This difference highlights the complexity of AKHR regulation (Wang et al 2012), and suggests that the common trend in changes of *akhr* expression level upon stress exposure is the result of multiple regulatory processes, some of which probably downstream of Vg/JH, rather than the direct consequence of the stressors.

The theory of a dynamic energy budget (DEB), which aims to identify the strategy of energy allocation, indicates that environmental stressors can strongly affect the energy balance of an organism (Kooijman, 2010). Our results point toward a similar trend with a minor reduction of glycogen level (immune stress) and *akhr* expression level. The consequences on bees are not yet known, but previous results have shown that immune-challenged honeybees (needle prick) tend to have a limited flight activity (Alaux et al., 2014).

Overall, our findings indicate that honeybees can exhibit a rapid and remarkable physiological plasticity, at the individual level, for adapting to ecologically relevant stressors. If bee responses are likely tuned to maintain the colony homeostasis but also contribute to its resilience, then they tend to include a decrease in metabolic activity. Future studies on longer timescales will help to produce a better understanding of whether such stress responses actually entail costs that may impact the performance and/or survival of bees.

II.2. Données complémentaires sur le stress social

Dans le même contexte que l'étude précédente, j'ai testé les réponses des abeilles à l'isolement social. Même si l'isolement social est rare chez les insectes sociaux, il peut nous renseigner sur l'évolution de la socialité et les conséquences des interactions sociales sur la physiologie et la longévité des individus en conditions normales. Les interactions sociales étant la clef pour le maintien d'une bonne organisation au sein de la colonie, les insectes sociaux et notamment les abeilles, sont des modèles de choix pour étudier comment l'isolement affecte la santé des individus. Ainsi, cette étude a eu pour vocation de déterminer le rôle des interactions sociales (apparues avec la socialité) sur la physiologie et le métabolisme des individus, tout en regardant les effets potentiellement bénéfiques de ces interactions.

METHODES

Les paramètres étudiés ont été identiques à ceux de l'étude précédemment décrite, traitant de l'effet d'un stress immunitaire, thermique ou de xénobiotiques. Les expérimentations sur le stress social, ont été réalisées en parallèle de celles sur le stress thermique en 2015 et partagent donc le même groupe contrôle. Pour éviter les redondances, nous allons uniquement définir ici la condition « stress social ».

Stress social

Le stress social a été provoqué par isolement total dès la capture sur le terrain des nourrices, gardiennes ou butineuses. Chaque abeille a été placée individuellement dans une cagette plastique (10.5 x 7.5 x 11.5 cm). Ainsi les abeilles ont été privées de tout contact avec des congénères au contraire des abeilles contrôles réunies en groupes de 20 abeilles (5 abeilles suivies + 15 accompagnatrices). Elles ont été placées dans les mêmes conditions, à 30°C. La taille de l'échantillon a été de 18 abeilles par traitement et caste comportementale, pour chaque variable testée.

RESULTATS

Effet du stress sur le taux de survie

Aucun effet de l'isolement social n'a été observé sur les taux de survie sur 24 heures, quel que soit la caste comportementale (Chi² tests, tous les P > 0.61), avec une variation comprise entre 93 % et 100 % (n total= 180 abeilles).

Effet de l'isolement sur la physiologie liée au développement comportemental

Une différence significative dans l'expression des gènes codant pour la vitellogénine et l'hormone juvénile estérase a été observée entre les castes comportementales : les nourrices présentant une sur-expression de *vg* et *jhe* par rapport aux butineuses, les gardiennes ayant des niveaux intermédiaires (Figure II-8). Cependant l'isolement social n'a pas modifié l'expression de ces gènes. (*vg* : $P = 0.64$; *jhe* : $P = 0.69$; Figure II-8).

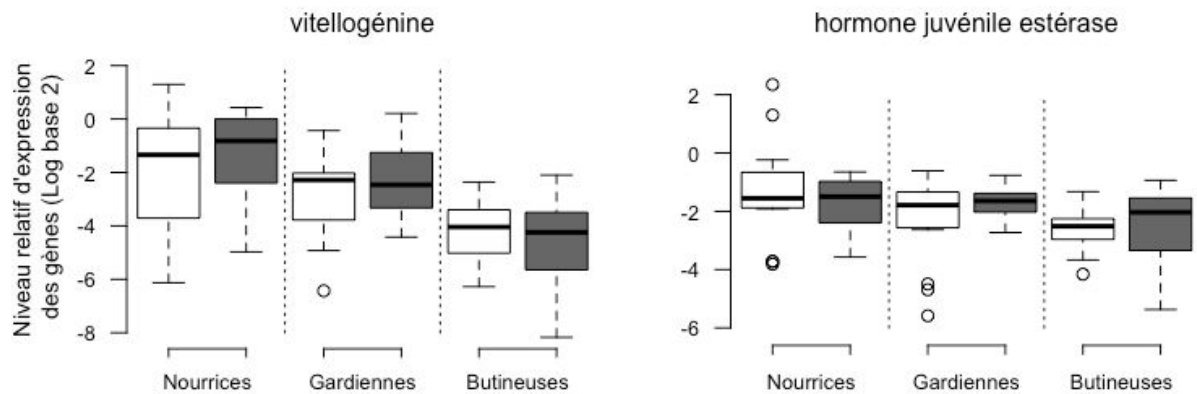


Figure II - 8. Niveaux d'expression des gènes codant pour la vitellogénine et l'hormone juvénile estérase en réponse à l'isolement social pour chaque caste comportementale.

Les niveaux relatifs d'expression des gènes sont indiqués pour les abeilles contrôles (boîtes blanches) et les abeilles isolées (boîtes noires) ($n = 18$ abeilles par groupe). Aucune différence n'a été observée entre les abeilles contrôles ou isolées du même groupe (ANOVA). Les boîtes montrent les valeurs comprises entre le 1^{er} et le 3^{ème} interquartile et les lignes les médianes. Les moustaches englobent 90 % des individus, les valeurs au-delà sont représentées par les cercles.

Effet de l'isolement social sur le métabolisme

Performances endothermiques

Les performances endothermiques sont restées inchangées que ce soit en fonction de la caste comportementale ($P = 0.27$), du traitement ($P = 0.051$) ou de la durée post-stress ($P = 0.32$). En regroupant les données de trois castes comportementales et des deux pas de temps, il faut cependant noter que l'effet de l'isolement sur les performances endothermiques, est proche de la significativité avec une tendance à l'augmentation (Figure II-9).

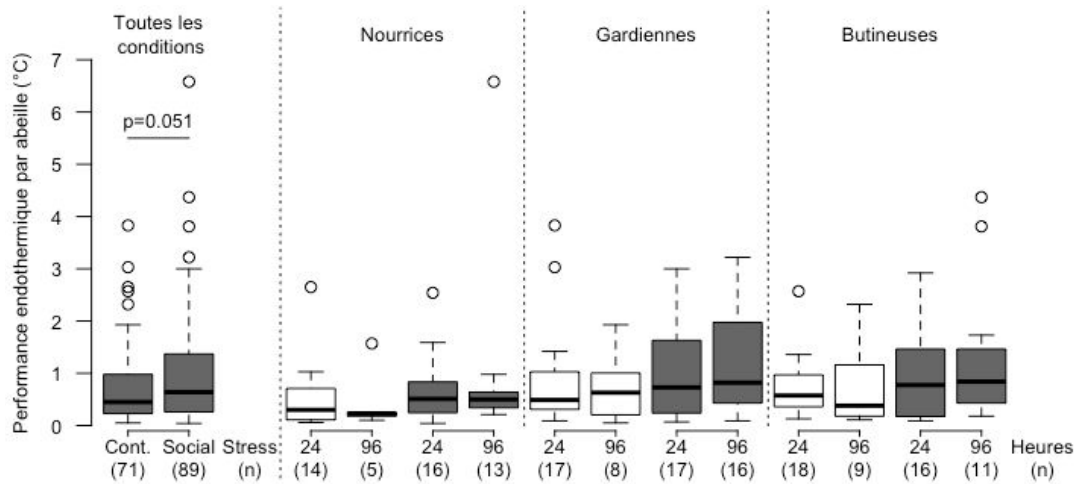


Figure II - 9. Performances endothermiques des abeilles en fonction du traitement et de la caste comportementale.

La capacité endothermique (°C) est indiquée à 24 et 96 heures après le début de l'exposition au stress (taille des échantillons entre parenthèses). Les performances endothermiques n'ont pas varié en fonction de la caste comportementale, du traitement ou du temps post-stress (ANOVA). Les boîtes, des abeilles contrôles (blanches) et des abeilles stressées (noires), montrent les valeurs comprises entre le 1^{er} et le 3^{ème} interquartile et les lignes les médianes. Les moustaches englobent 90 % des individus, les valeurs au-delà sont représentées par les cercles.

Niveau de glycogène

Aucune différence dans les niveaux de glycogène n'a été détectée entre les castes comportementales, que ce soit dans l'ensemble tête/thorax ($P = 0.39$) ou dans l'abdomen ($P = 0.39$) (Figure II-10A et B). L'isolement n'a pas induit de modifications du niveau du glycogène stocké dans l'abdomen ($P = 0.65$) mais un effet a été observé dans l'ensemble tête/thorax ($P = 0.012$). En effet, en regroupant toutes les castes comportementales les abeilles en isolement social ont présenté significativement plus de glycogène stocké dans l'ensemble tête/thorax que les abeilles contrôles (Figure II-10).

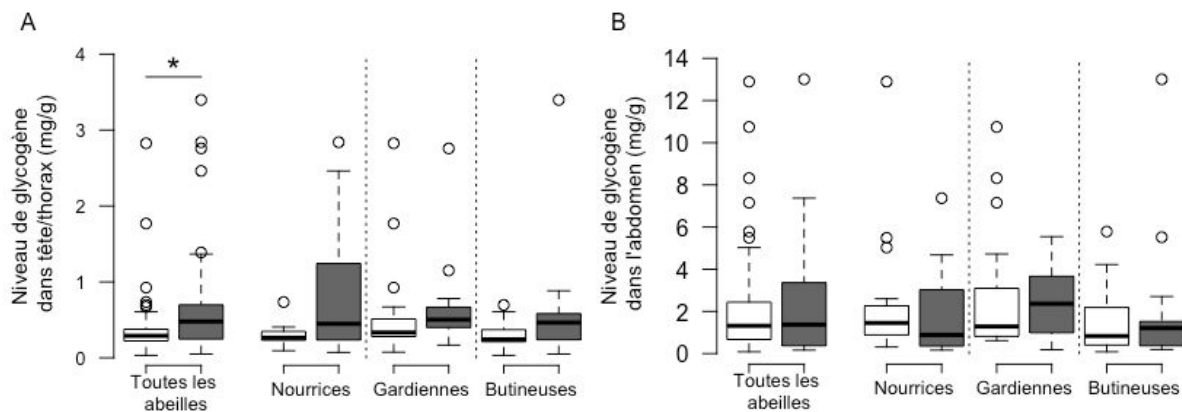


Figure II - 10. Niveaux de glycogène dans l'ensemble tête/thorax et dans l'abdomen suite à un isolement social et en fonction de la caste comportementale.

Les quantités relatives de glycogène stocké dans l'ensemble tête/thorax (A) et abdomen (B) sont indiquées pour les abeilles isolées et contrôles appartenant aux différentes castes comportementales ($n = 18$ abeilles par groupe). Les niveaux de glycogène dans l'abdomen sont restés stables ($P = 0.65$), alors que les niveaux dans l'ensemble tête/thorax ont significativement augmenté suite à une exposition au stress ($P = 0.012$). Les boîtes, des abeilles contrôles (blanches) et des abeilles stressées (noires), montrent les valeurs comprises entre le 1^{er} et le 3^{ème} interquartile et les lignes les médianes. Les moustaches englobent 90 % des individus, les valeurs au-delà sont représentées par les cercles.

Niveau d'expression du gène du récepteur à l'hormone adipokinétique

Contrairement aux stress immunitaire ou thermique, l'isolement social n'a pas affecté l'expression de l'*ahkr* ($P = 0.077$) (Figure II-11). De plus aucune différence n'a été identifiée entre les castes comportementales ($P = 0.67$).

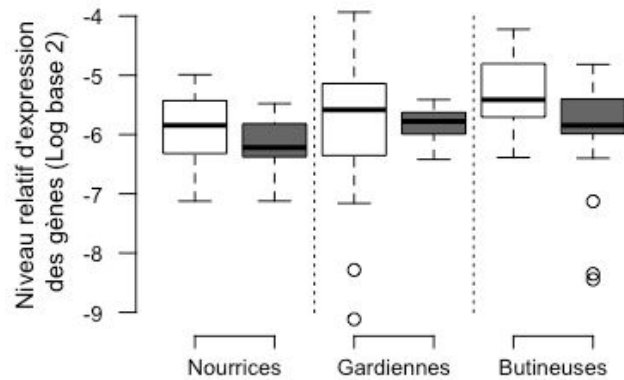


Figure II - 11. Niveaux d'expression du gène codant pour le récepteur à l'hormone adipokinétique en réponse à un stress et selon la caste comportementale.

Les niveaux d'expression relative des gènes sont indiqués pour les abeilles contrôles (boîtes blanches) et les abeilles isolées (boîtes noires) ($n = 18$ abeilles par groupe). Aucune différence n'a été montrée entre les abeilles contrôles ou isolées du même groupe (ANOVA). Les boîtes montrent les valeurs comprises entre le 1^{er} et le 3^{ème} interquartile et les lignes les médianes. Les moustaches englobent 90 % des individus, les valeurs au-delà sont représentées par les cercles.

DISCUSSION

Un effet négatif de l'isolement social sur la survie des individus a déjà été rapporté lors d'expérimentations en laboratoire chez les fourmis (Boulay et al., 1999; Koto et al., 2015) et les abeilles (Arnold, 1978; Sitbon, 1967). De plus, chez les fourmis il a été montré que les individus en isolement augmentent leur activité locomotrice créant ainsi un déséquilibre énergétique pouvant impacter le vieillissement et la survie de ces individus (Koto et al., 2015). Une augmentation de la locomotion a également été observée au cours d'expérimentations préliminaires (non présentées ici), sur des nourrices et des butineuses placées en isolement (comportement enregistré par 'scan sampling' les 5 premiers jours sur les 20 de l'expérimentation). Les nourrices ont montré une sensibilité supérieure à celle des butineuses face à l'isolement, avec une plus forte mortalité et une activité locomotrice plus intense. Sur la base de ces paramètres nous pouvons estimer que l'isolement social est bien un stress pour les abeilles. Ainsi une modification du métabolisme avec une consommation plus importante des réserves, reflétant l'augmentation d'activité, était attendue. Dans cette étude, uniquement une tendance à l'augmentation des capacités endothermiques des abeilles isolées a été observée, suggérant une élévation du métabolisme, particulièrement au niveau du thorax. Cette augmentation est liée à des niveaux de glycogène plus élevés dans l'ensemble tête/thorax,

principales sources d'énergie des muscles du thorax. Dans nos conditions expérimentales, seules des modifications au niveau énergétique ont été observées alors qu'au niveau physiologique l'expression de *vg* et *jhe* n'a pas été impacté par l'isolement (du moins sur le court terme). Ainsi il semblerait qu'un stress social chez l'abeille n'a pas d'effet sur la physiologie liée à la division du travail mais provoquerait une augmentation du métabolisme énergétique, à l'image de ce qui a déjà été décrit chez les fourmis.

Chez les mammifères le système dopaminergique assure la motivation pour la recherche de 'nouveau', ainsi que la perception d'une récompense (Wise, 2004). Il a été supposé que l'octopamine (OA), dans un contexte social, avait un rôle analogue dans le cerveau des insectes (Barron et al., 2007). Chez les fourmis, en plus des modifications au niveau du métabolisme, un isolement social induit une modification des niveaux d'amines biogènes dans le cerveau, avec une diminution de l'OA (Wada-Katsumata et al., 2011) alors qu'elle permet de réduire les effets d'une privation sociale chez cette espèce (Boulay et al., 2000). En effet, à la suite d'un isolement social les fourmis s'engagent dans de nombreuses interactions, lors de la remise en contact avec des congénères, afin de restaurer les liens sociaux. Les fourmis préalablement traitées avec de l'OA n'effectuent pas ces comportements ce qui signifie que l'OA compense les effets liés à l'isolement (Boulay et al., 2000). Sur la base de nos résultats sur le métabolisme, il semblerait qu'il existe des similitudes entre l'effet du stress social chez la fourmi et l'abeille, ainsi un effet similaire de l'OA pourrait être attendu chez l'abeille.

Cette étude montre donc que l'isolement social représente un stress chez l'abeille qui va augmenter son activité locomotrice et son métabolisme avec pour conséquence potentielle une réduction de sa survie. Mais cela démontre surtout que les interactions sociales sont devenues au cours de l'évolution de la socialité un paramètre important de régulation de l'homéostasie physiologique des abeilles.

III. Impacts de stress biotiques et abiotiques sur le métabolome des émergentes

L'exposition au stress entraîne généralement chez les organismes des changements physiologiques et comportementaux conduisant à un nouvel équilibre des métabolites (Fiehn, 2002). Les métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) sont impliqués dans de nombreux processus biologiques, ainsi la détermination de l'évolution des métabolites en réponse à un stimulus représente une étape importante dans la compréhension de la réponse au stress. La métabolomique a d'abord été utilisée dans le cadre d'analyses en toxicologie chez les mammifères à partir de fluides biologiques comme l'urine ou le sang (Lindon et al., 2000). Chez l'insecte, l'hémolymphe a sensiblement les mêmes caractéristiques que le sang, elle est donc impliquée dans le transport d'hormones, nutriments, énergie et métabolites (Banno et al., 2010; Hou et al., 2010). L'approche métabolomique peut ainsi être appliquée à l'insecte, ce qui semble d'autant plus important pour des espèces bio-indicatrices de la qualité de l'environnement comme l'abeille.

Un profil métabolique spécifique des abeilles exposées au parasite *Nosema ceranae* a été déterminé précédemment par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (Aliferis et al., 2012). Cette étude a permis de confirmer, à l'image de ce qui avait déjà été montré chez d'autres insectes, que la métabolomique était une méthode fiable pour déterminer le profil des abeilles saines ou malades. Cette approche peut donc s'avérer précieuse pour mieux comprendre les réponses des organismes à différents stimuli.

Dans l'article 1, présenté dans ce chapitre, j'ai montré que l'exposition à un stress immunitaire ou thermique a tendance à diminuer le métabolisme énergétique. Afin d'aller plus loin sur l'étude des modifications physiologiques induites par le stress, j'ai développé une étude de métabolomique pour identifier les métabolites présents dans l'hémolymphe des abeilles et déterminer si leurs niveaux sont affectés par le stress. Pour cela des abeilles émergentes ont été exposées à différentes sources de stress comme précédemment (social, immunitaire ou thermique).

MATERIEL ET METHODES

Protocole expérimental

Les expérimentations ont été menées en 2014 sur des abeilles émergentes provenant d'un mélange de colonies d'abeilles hybrides, majoritairement *Apis mellifera mellifera*.

Le jour précédent l'expérimentation, des cadres contenant du couvain operculé, au dernier stade de développement, ont été retirés de trois ruches donneuses et placés pour la nuit en étuve (34°C et 70 % d'humidité). Le premier jour de l'expérimentation, toutes les abeilles émergentes ont été récupérées et mélangées pour minimiser l'effet dû à l'origine de la colonie. Des groupes de 30 (essai 1) ou 40 (essais 2 et 3) abeilles ont ensuite été formés et répartis dans des cagettes en plastique (10,5 x 7,5 x 11,5 cm) contenant du pollen, une solution sucrée à 90 % de miel et un Beeboost (phéromone mandibulaire synthétique de la reine, Contech). Après ces 3 jours, les abeilles ont été exposées aux différents stress et échantillonnées 48 ou 96 heures après le début du traitement (voir ci-dessous). Le groupe contrôle a été le même pour tous les groupes ; ces abeilles n'ont reçu aucun stress et ont été placées dans une autre étuve (30°C et 70 % d'humidité). Chaque jour, la mortalité a été relevée. Dans le même temps, le pollen et la solution sucrée ont été changés et pesés pour estimer les quantités consommées par abeille. Cette étude a été répétée trois fois sur une période d'un mois. Au total l'expérimentation a été conduite sur 24 cagettes pour chaque condition contrôle, stress social et hyperthermie et 30 cagettes pour le stress immunitaire, soit sur 3 760 abeilles au total.

Exposition au stress

Le mode d'exposition au stress immunitaire et thermique a été identique à celui présenté dans l'Article 1. Les abeilles ont donc été exposées soit à un stress immunitaire simple, sans infection pathogénique, soit à une hyperthermie continue à 37°C. En revanche, pour le stress social les phéromones royales (Beeboost) mimant la présence d'une reine, ont été retirées des cagettes. Des observations préalables ont mis en évidence une réduction d'activité (locomotion) en présence de phéromones royales.

Analyses métaboliques

Echantillonnage

L'hémolymphe a été collectée 48 ou 96 heures après le début de l'exposition au stress. Pour collecter l'hémolymphe, les abeilles ont été piquées, à l'aide d'une aiguille, entre le troisième et le quatrième tergite. Entre 3 à 5 µL d'hémolymphe par abeille ont été prélevés à l'aide de capillaires (ringcaps®), à 48 et 96 heures après le début du stress. Afin d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour permettre l'analyse des métabolites, l'hémolymphe de toutes les abeilles d'une même cagette a été regroupé et mélangé. Ainsi un échantillon représente une cagette. Les échantillons d'hémolymphe ont été stockés à - 20°C. Au total, 12 et 11 échantillons 'contrôle', 11 et 8 échantillons 'stress immunitaire', 11 et 9 échantillons 'stress social' et 10

échantillons 'stress thermique' ont été analysés à 48 et 96 heures après le début du stress, respectivement ; l'hémolymphe des abeilles exposées à une hyperthermie n'ayant pas pu être collectée à 96 heures (volume trop faible).

Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Pour préparer l'hémolymphe pour l'analyse, 40 μL de chaque échantillon ont été mis en suspension dans 60 μL de tampon de phosphate de sodium à 1,5 M (dans D_2O ; pH 7,01) et centrifugé. Le surnageant (90 μL) a été analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN).

Les spectres de RMN ont été mesurés à 500 MHz avec un spectromètre Avance III (Bruker) à température ambiante (300 K). Les spectres de RMN à une dimension (RMN-1D) ont été obtenus avec une longueur de spectre de 20 Hz et un temps de relaxation de 4 s. Pour faciliter la détermination des spectres, l'outil d'acquisition applique directement la transformation de Fourier. Les spectres obtenus par RMN-1D ont été traités sous Amix 3.9.10. Chaque spectre a été segmenté en 800 signaux chimiques (bucket) compris entre 0,5 et 8,5 ppm, correspondant à un saut de 0,01 ppm. Les buckets, entre 4,55 et 4,75 ppm, qui représentent les signaux résiduels de l'eau, ont été supprimés. L'intensité de chaque bucket a été normalisée par rapport à l'intensité totale de chaque échantillon. Le nouveau fichier ainsi obtenu a été converti en un format utilisable pour les analyses statistiques multivariées sous SIMCA.

Pour visualiser la distribution des échantillons des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées. À la suite des ACP, des analyses discriminantes des moindres carrés partiels (PLS-DA) ont été utilisées pour déterminer la présence de marqueurs biologiques potentiels. Les modèles statistiques ont été validés selon deux critères, la capacité d'explication (R^2) et de prédiction (Q^2) du modèle. Ces méthodes permettent de déterminer la liste des métabolites d'intérêt parmi les 800 buckets obtenus initialement.

Détermination des métabolites

La détermination des métabolites d'intérêt, préalablement identifiés par RMN-1D, a été réalisée par RMN à deux dimensions (RMN-2D), incluant six méthodes complémentaires (NOESY 1D ; COSY ; TOCSY ; JRES ; HSQC ; HMBC). De manière à disposer d'une quantité suffisante de matériel biologique, tous les échantillons d'un même groupe (même exposition au stress) ont été mélangés. Au total 7 échantillons ont été analysés par RMN-2D, soit un échantillon par groupe et pas de temps. Par échantillon, 750 μL d'hémolymphe a été séché à 18°C et remis en suspension dans 650 μL d'oxyde de deutérium (D_2O) contenant 10 % de tampon phosphate. Pour identifier les métabolites obtenus, la base de données sur le métabolome humain (Human Metabolome Database – HMDB) a été interrogée dans un premier temps. Par la suite, la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a également été interrogée de manière à

confirmer que l'abeille (ou une bactérie contenue dans l'abeille) est capable de métaboliser la molécule en question.

Statistiques

Les statistiques post-analyses métabolomiques ont été réalisées avec le logiciel de statistique R version 3.2.1. (R Development Core Team. 2015).

Probabilité de survie

Les différences de probabilités de survie entre les traitements ont été analysées par le test de Kaplan-Meier (fonction 'surfit' du package 'survival' de R) (Therneau and Lumley 2014). Le seuil de significativité a été placé à $P < 0,05$.

Consommation de pollen et solution sucrée

Pour analyser la différence de consommation de pollen et de sucre, le jeu de données a été divisé en deux parties, une avant l'exposition au stress (jusqu'au jour 3), donc quand les abeilles étaient toutes dans les mêmes conditions expérimentales, et une après le début de l'exposition au stress (jour 4 à 7). La moyenne de consommation de pollen et de sucre a été calculée par jour et par abeille. Les différences de consommation entre chaque groupe ont été analysées par des ANOVA à mesures répétées suivi par des comparaisons post-hoc de Tukey. Avant l'exposition au stress, l'ensemble des cagettes était dans les mêmes conditions donc l'effet cagette a été analysé comme facteur fixe. Après le début du stress, le traitement et le jour (temps après le début de l'exposition au stress) ont été analysés en facteurs fixes. Dans les deux cas, le réplica a été analysé en tant que facteur aléatoire.

RESULTATS

Probabilité de survie

La probabilité de survie des abeilles exposées à un stress immunitaire a été significativement plus faible que dans les autres groupes ($P < 0,001$; Figure II-12). La probabilité de survie du groupe contrôle a été significativement plus élevée que dans les groupes stressés ($P < 0,001$). La probabilité de survie n'a pas été différente entre les abeilles exposées à une hyperthermie ou à un stress social ($P = 0,43$). À 7 jours, à la fin de l'expérimentation, la probabilité de survie est restée supérieure à 70 % quel que soit le groupe.

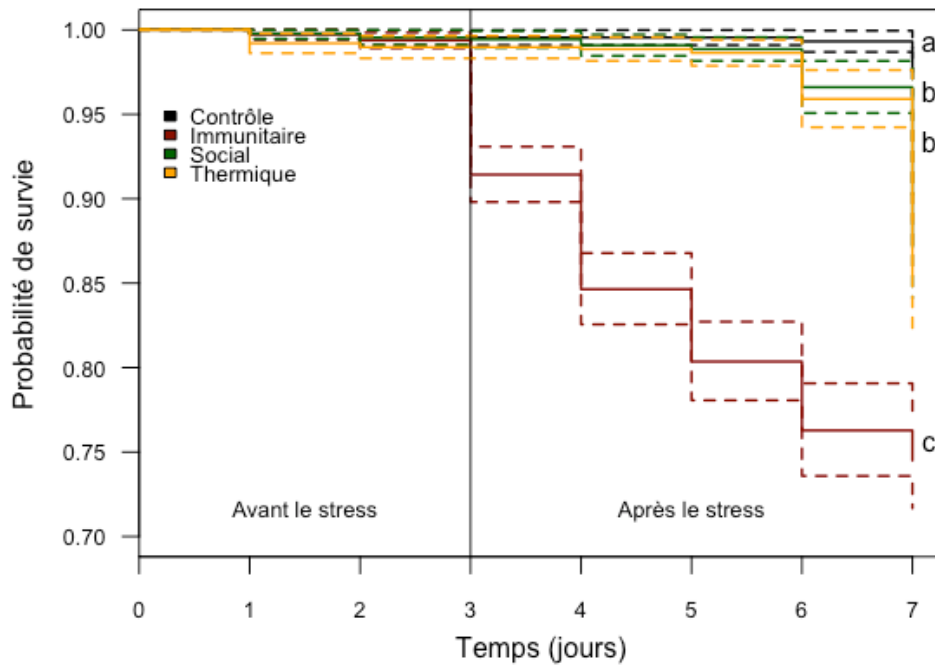


Figure II - 12. Effet du traitement sur la probabilité de survie des abeilles.

Les données montrent la survie des abeilles contrôles (noir) ou exposées à un stress immunitaire (rouge), social (vert) ou thermique (jaune). Les catégories identifiées par différentes lettres sont significativement différentes (Kaplan-Meier).

Consommation de pollen et solution sucrée

Aucune différence significative dans la consommation de pollen n'a été observé entre les groupes avant exposition au stress ($P = 0,52$). La moyenne de la consommation de pollen par abeille, sur les trois premiers jours de l'expérimentation, quand les abeilles étaient placées dans les mêmes conditions, a été de $6,61 \pm 0,1$ mg. La consommation de pollen a été impacté par l'interaction entre le traitement et le jour ($P < 0,001$), ce qui est particulièrement visible aux jours 4 et 7, soit le premier et le quatrième jour après le début de l'exposition au stress (Figure II-13). L'effet du traitement a donc été modulé par l'âge des abeilles. Sur les quatre jours de stress, aucune différence dans la consommation de pollen n'a été identifiée entre les groupes.

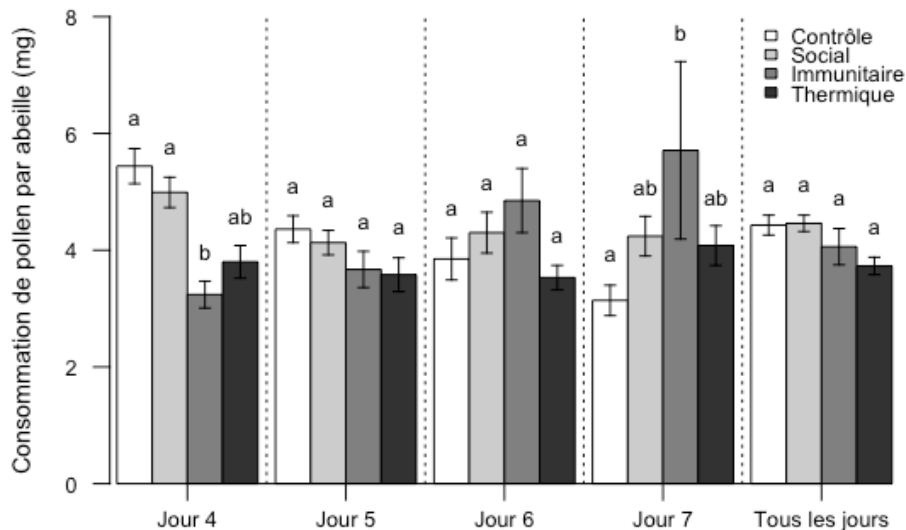


Figure II - 13. Consommation de pollen par abeille.

Les moyennes et erreurs standard de consommation de pollen par abeille sont représentées en fonction du traitement et du jour après le début du stress. Le jour 4 de l'expérimentation est le premier jour de l'exposition au stress. Par jour ou pour la catégorie 'tous les jours', les traitements identifiés par différentes lettres sont significativement différents (ANOVA suivi de comparaison post-hoc de Tukey).

Avant exposition au stress, aucune différence entre les groupes en termes de consommation de sucre n'a été identifiée ($P = 1$). En moyenne 18.86 ± 0.41 mg de solution sucrée a été consommée par abeille et par jour. L'interaction entre le traitement et le jour a été observée sur la consommation de sucre après le début du stress ($P < 0,001$; Figure II-14). La consommation de sucre par abeille n'a pas été différente entre les abeilles exposées à un stress social et les contrôles ($P = 0,82$). En revanche, une diminution de la consommation de sucre a été observée entre les contrôles et les abeilles soumises à un stress immunitaire ou thermique ($P < 0,001$).

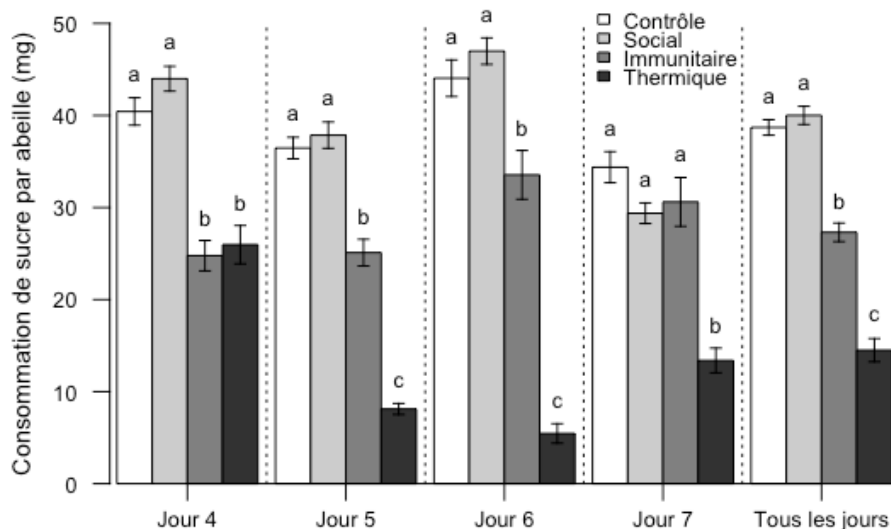


Figure II - 14. Consommation de solution sucrée par abeille.

Les moyennes et erreurs standard de consommation de solution sucrée par abeille sont représentées en fonction du traitement et du jour après le début du stress. Le jour 4 de l'expérimentation est le premier jour de l'exposition au stress. Par jour ou pour la catégorie 'tous les jours', les traitements identifiés par différentes lettres sont significativement différents (ANOVA suivi de comparaison post-hoc de Tukey).

Métabolites d'intérêt

Sur les 800 buckets de base, 70 ont été sélectionnés comme discriminants, 41 ont été associés à une molécule unique. Cela a permis l'identification de 10 métabolites ou groupes de métabolites d'intérêt. Parmi ces métabolites d'intérêt (discriminant les abeilles contrôles des abeilles stressées) deux sont impliqués dans le métabolisme des phospholipides (phosphorylcholine et glyceryl phosphorylcholine), un acide aminé (L-Lysine), issu de la dégradation des acides aminés (putrescine), des acides gras et 5 sucres (α/β -D-fructose ; α/β -D-glucose and α -trehalose). À 48 heures, aucune différence entre les profils métaboliques des abeilles exposées à un stress social ou immunitaire et les abeilles contrôles n'a été détectée. Par contre, il a été possible de discriminer les abeilles exposées à une hyperthermie (après 48 h.) et celles exposées à un stress immunitaire après (96 h.), des abeilles contrôles (Figure II-15). Dans le groupe exposé à un stress thermique, une augmentation du niveau de tous les sucres a été observée alors que les métabolites impliqués dans les voies des lipides ou des acides aminés étaient présent en plus faible quantité que dans le contrôle. Les quantités relatives de presque chaque métabolite se sont inversées entre 48 et 96 h. d'exposition, que ce soit pour le groupe exposé à un stress social ou immunitaire. Par exemple, les sucres qui étaient en faible quantité à 48 heures dans le groupe exposé à un stress social, ont vu leur niveau augmenter à 96 heures par rapport au contrôle. L'inverse a été observé pour le groupe exposé à un stress immunitaire.

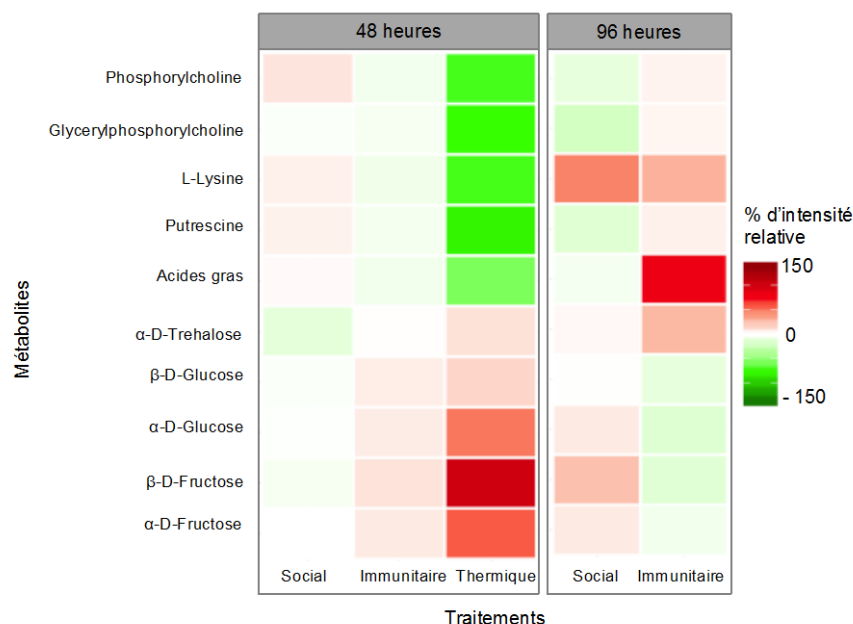


Figure II - 15. Heatmap de l'intensité relative des métabolites dans l'hémolymphe des abeilles.

Chaque carré de couleur représente le pourcentage d'intensité relative des 10 métabolites d'intérêt dans les groupes stressés par rapport à leur groupe contrôle, 48 ou 96 heures après le début du stress. À 96 heures l'hémolymphe des abeilles exposées à un stress thermique n'a pu être collectée.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer l'impact de différents stress sur les profils métaboliques des abeilles, en utilisant pour la première fois des méthodes de RMN 1D et 2D. Il en ressort que le stress thermique a eu un impact plus fort que les autres sources de stress, que ce soit sur la consommation alimentaire ou sur le profil métabolique des abeilles.

Le pollen est principalement consommé dans les premiers jours après l'émergence et permet le développement des glandes hypopharyngiennes. Ainsi, la consommation de pollen plus élevée pendant les trois premiers jours de l'expérimentation quels que soient les groupes, peut s'expliquer par les besoins des abeilles. Cependant, une diminution très nette de la consommation de sucre a été observée chez les abeilles en hyperthermie ou soumises à un stress immunitaire. Cette baisse coïncide avec la diminution du métabolisme énergétique (AKHr pour le stress immunitaire et l'hyperthermie, et glycogène chez les abeilles exposées à un stress immunitaire). Elle peut paraître surprenante car une augmentation de la consommation de glucides serait attendue pour limiter la baisse du métabolisme énergétique mais il se peut tout simplement que les abeilles réduisent leur activité afin que le stress n'impacte pas leur survie (Alaux et al., 2014).

L'analyse métabolomique a permis d'identifier 10 métabolites d'intérêt sur l'ensemble de nos modalités, la plupart impliqués dans des voies métaboliques différentes : phosphorylcholine et glycerylphosphorylcholine (phospholipides), des acides gras, un acide L-lysine (acide aminé) et la putrescine issue de la dégradation des acides aminés. Des métabolites impliqués dans la voie énergétique des sucres, ont également été identifiés. Certains métabolites, comme la tyrosine, sont des précurseurs de plusieurs hormones de stress (octopamine, dopamine) chez l'insecte (Hirashima et al., 2000; Sukhanova et al., 1997), il peut donc paraître surprenant de ne pas les retrouver dans notre étude. Cela peut être dû à une limitation de la méthode dans la détection de métabolites dans l'hémolymphe ou tout simplement que les changements ont lieu dans des fenêtres de temps plus courtes ou plus longues que celles étudiées. Le rôle de la phosphorylcholine et de la glycerylphosphorylcholine dans la réponse au stress n'est pas connu chez l'abeille mais il semblerait que ces métabolites peuvent avoir une fonction anti-inflammatoire chez les mammifères (Tóké et al., 2014). La L-lysine, quant à elle, aurait un effet protecteur contre l'anxiété chez le rat (Smriga and Torii, 2003a), probablement de par son effet antagoniste sur les récepteurs à la sérotonine (Smriga and Torii, 2003b). Il est ainsi intéressant de la voir à des niveaux élevés à 96 h. chez les abeilles soumises à un stress social et immunitaire.

Chez les abeilles en hyperthermie, une augmentation du taux de sucre dans l'hémolymphe a été observée à 48 h. alors que ces abeilles ont consommé moins de sucre. Cette augmentation des sucres ne serait donc pas due à un apport plus important en sucres dans l'organisme. Cela pourrait ainsi résulter d'une dégradation plus importante du glycogène, principale source de carbohydrates chez les abeilles, ce qui peut laisser supposer un rôle protecteur des sucres. Ce résultat est en effet cohérent avec une précédente étude sur l'effet du stress thermique chez la drosophile (Malmendal et al., 2006). De plus, le tréhalose est connu pour jouer un rôle dans la protection de l'intégrité des protéines et des membranes lors de l'exposition à différents stress comme la dessiccation, l'hyper ou l'hypothermie chez les invertébrés (Chen and Haddad, 2004; Newman et al., 1993). Le même effet a été observé pour le stress immunitaire et donc nous pouvons aussi avancer un rôle protecteur des sucres contre des modifications du métabolisme. Aucun changement n'a été observé à 48 h. pour le stress social.

En revanche, une inversion du profil métabolique, à 96 h., a été observé lors d'un stress immunitaire. Ce résultat est cohérent avec ma première étude (article 1) qui montre une tendance à la diminution du glycogène stocké chez les abeilles adultes soumises à un stress. La diminution des sucres à 96 heures peut être interprétée comme un manque de substrat et un épuisement des abeilles. Le stress social étant apparemment moins intense pour les abeilles (pas de diminution de consommation de sucre), l'augmentation des taux de sucres à 96 h. peut être le reflet d'une réponse ou d'un impact plus tardif par rapport au stress immunitaire.

Si cette étude n'a pas permis de mettre en évidence de métabolites spécifiques à chaque stress, le stress thermique semble tout de même avoir un impact sur la composition en métabolites de l'hémolymphe, avec l'augmentation des sucres. Cela est cohérent avec les résultats de l'article 1, où sur la base de la physiologie, un effet prépondérant du stress thermique avait été mis en évidence. Par conséquent, l'approche métabolomique semble être un outil complémentaire prometteur pour mieux identifier les réponses ou l'impact de stress chez les abeilles. Toutefois il apparaît clairement que ces modifications sont très dynamiques au cours du temps et que ce paramètre devra être pris en compte dans les futures études du stress au niveau physiologique.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre les réponses des différentes castes comportementales suite à l'exposition à un stress xénobiotique, immunitaire, social ou thermique ont été caractérisées.

Sur la base des caractéristiques physiologiques associées à chaque caste comportementale, une réponse différentielle était attendue. Cependant toutes les castes comportementales ont répondu et de la même manière à chaque stress.

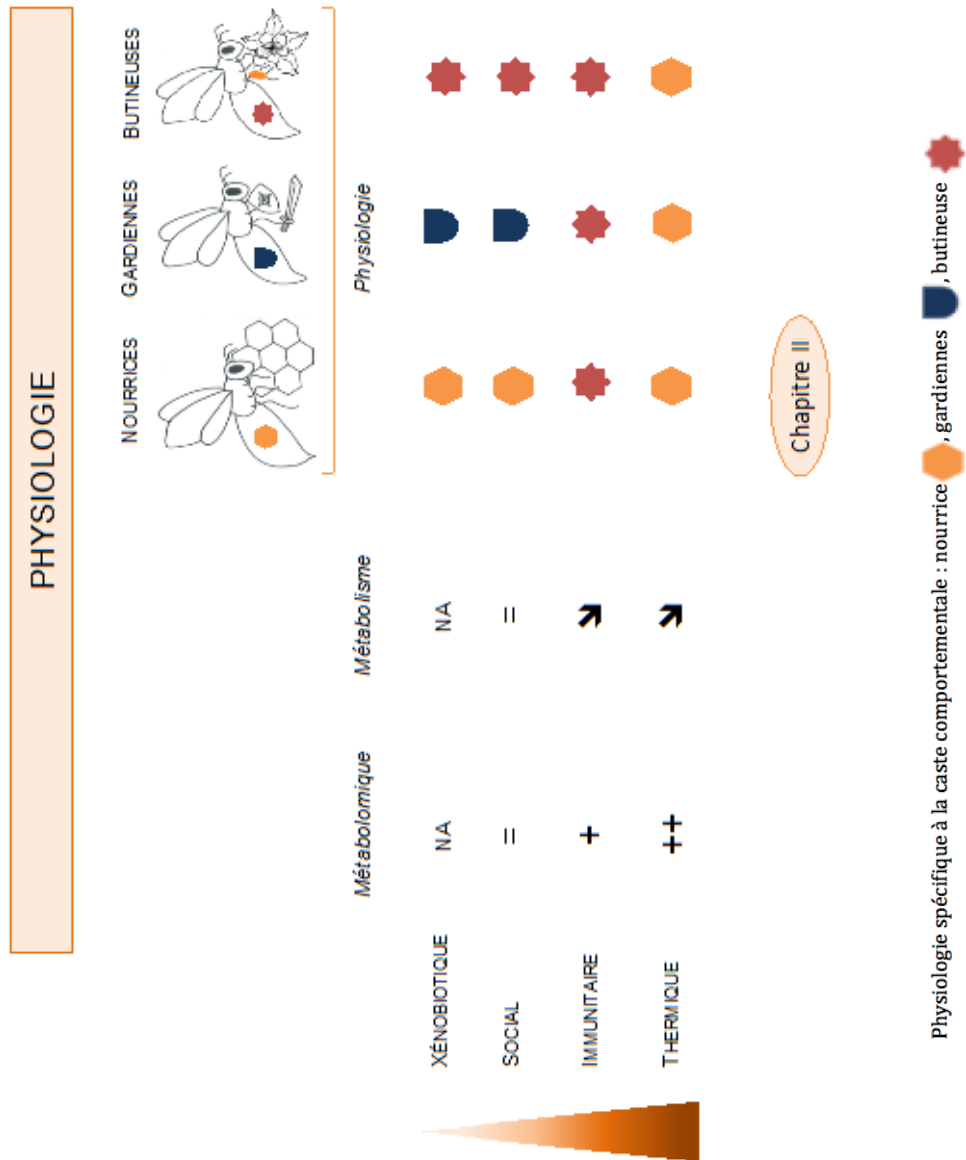
Concernant l'existence d'une spécificité de réponse selon le type de stress, nous avons mis en évidence des réponses prépondérantes aux facteurs de stress ayant une pertinence écologique pour les abeilles (challenge immunitaire et thermique). Le sens des réponses observées suite au stress immunitaire et thermique (profil de butineuse et de nourrice, respectivement) serait en faveur du maintien de l'homéostasie sociale et ne serait pas uniquement une réponse individuelle.

Les études présentées ici montrent une tendance à la modification du métabolisme énergétique, ce qui a, une nouvelle fois, été plus marqué lors de l'exposition à un stress thermique.

Dans ce chapitre sur l'effet du stress à l'échelle individuelle, nous avons montré un impact sur la physiologie en lien avec la division du travail et une tendance à la diminution des réserves énergétiques. Ces altérations physiologiques suggèrent une modification du comportement des abeilles soumises à un stress. Le prochain objectif est donc de déterminer l'impact de ces stress au niveau comportemental. Pour cela il convient de se placer au plus près des conditions de vie des abeilles car le comportement est largement influencé par le contexte social. C'est donc ce que j'ai cherché à faire dans la suite de ma thèse.

Résumé du Chapitre II :

- Réponse similaire entre les castes comportementales
- Réponse spécifique selon le type de stress (physiologie liée à la division du travail)
- Tendance à la diminution du métabolisme énergétique



CHAPITRE **III** ○ ○ ● ○ ○

Réponses comportementales :
Impact d'un stress immunitaire et pathologique



I. Avant-propos

Dans le chapitre précédent nous avons vu qu'un stress immunitaire simple peut avoir un impact sur la physiologie des abeilles mais également sur leur métabolisme énergétique.

À l'échelle de l'individu la présence d'un pathogène impact les réserves nutritionnelles des abeilles (Mayack and Naug, 2009). Ce coût énergétique peut induire une modification du comportement et un épuisement des individus parasités. Dans le cas d'une infection parasitaire, les modifications du comportement peuvent être attribuées directement au parasite comme un résultat de la manipulation de son hôte pour assurer sa transmission (Adamo, 2012; Biron and Loxdale, 2013). Dans les groupes sociaux, ces modifications du comportement peuvent également être assimilées à une adaptation de l'hôte pour limiter les contacts entre individus et donc la transmission des maladies (Cremer et al., 2007).

Une stimulation du système immunitaire due à la présence d'un pathogène tel que *Nosema* ou par une piqûre sans inoculation de pathogènes peuvent avoir des répercussions similaires sur les individus, comme une induction précoce de l'activité de butinage (Alaux et al., 2014; Dussaubat et al., 2013; Wang and Mofler, 1970). En outre, un stress immunitaire non-pathogénique peut également modifier les interactions sociales dans les colonies d'abeilles (Richard et al., 2012, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère un effet négatif sur la colonie, que ce soit au niveau organisationnel ou au niveau énergétique et donc *in fine* sur l'homéostasie globale de la colonie.

L'objectif principal dans ce chapitre est de **déterminer si les modifications physiologiques induites par un stress immunitaire ont des répercussions sur le comportement des abeilles.**

Sur la base des connaissances exposées en introduction et des résultats du chapitre II, il est possible de faire 2 hypothèses.

L'augmentation des dépenses énergétiques, liée au stress immunitaire :

- a un impact négatif sur les capacités de vol des butineuses
- modifie le comportement et/ou l'efficacité de butinage

Afin de mener à bien cet objectif, il était primordial de pouvoir suivre chaque abeille individuellement, tout en les plaçant dans un contexte social naturel. Cela est possible grâce au développement de nouvelles technologies, permettant le suivi automatique et continu d'individus marqués individuellement. Ces techniques reposent sur des enregistrements de photos, vidéos ou sur la lecture de transpondeurs. Dans tous les cas, les abeilles (ouvrières ou reines) sont équipées d'un marquage individuel. Chaque méthode ayant un fonctionnement et des contraintes propres, il existe plusieurs types de marquage d'abeilles (Figure III-1).

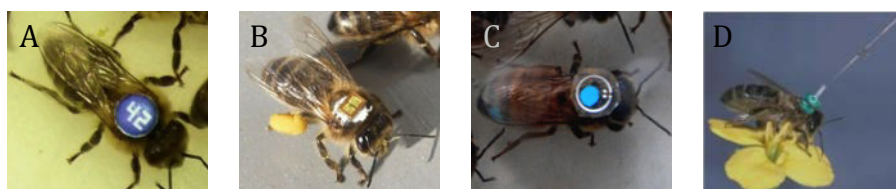


Figure III - 1. Dispositifs de marquage individuel des abeilles pour le suivi automatique. Pour les compteurs optiques des tags colorés et numérotés sont utilisés (A), pour la méthode d'identification par fréquence radio (RFID) plusieurs types de puces sont possibles (B ; C) avec un identifiant alphanumérique unique ; pour les radars harmoniques ce sont des petites antennes qui permettent de relier l'information (D). Photos © : A) C. Alaux ; B) Science/AAAS ; C) C. Bordier ; D) G. Orazzi.

Ces différentes méthodes permettent de réaliser des études variées, comme le suivi des vols de fécondation dans le cas de marquage de reines (Heidinger et al., 2014), ou du comportement de butinage pour les ouvrières avec l'enregistrement des temps et de nombre de vol pendant toute leur vie (e.g. Alaux et al., 2014; Perry et al., 2015). De manière générale, le sens du passage à l'entrée de la ruche est enregistré soit *i*) par la succession de deux zones de lecture permettant de savoir si l'abeille est sortie ou entrée dans la colonie (Figure III-2) ou *ii*) par la mise en place d'un trajet unique pour l'entrée ou la sortie de la colonie (Figure III-3).

Le compteur optique développé dans mon laboratoire repose sur le principe de reconnaissance de numéros ou de QR codes et de couleurs quand l'abeille passe dans le dispositif placé à l'entrée de la colonie (Figure III-2).

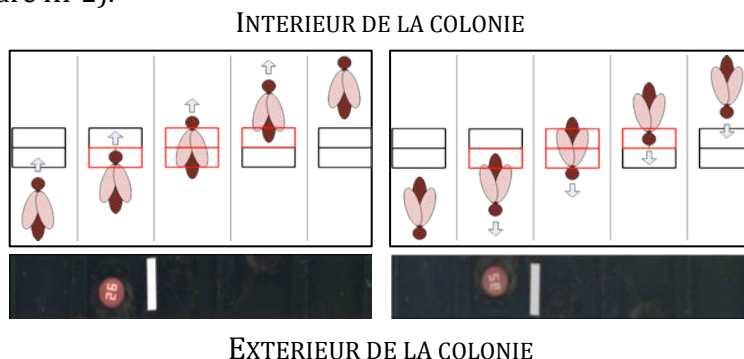


Figure III - 2. Fonctionnement du compteur optique. Réduction de l'entrée de la ruche avec uniquement 5 canaux. Les deux zones de lecture successives, zone non activée en noire et zone activée en rouge, permettent de déterminer le sens du trajet de l'abeille et ainsi si elle est « entrée » ou « sortie » de la colonie.

Le principe de la RFID repose sur la lecture du transpondeur lors du passage à proximité des antennes de lecture. Un signal radio est envoyé au transpondeur qui renvoie alors en réponse un signal radio codé contenant un identifiant alphanumérique propre à l'abeille. Le dispositif pouvant être adapté pour pouvoir déterminer la ressource collectée (Figure III-3).

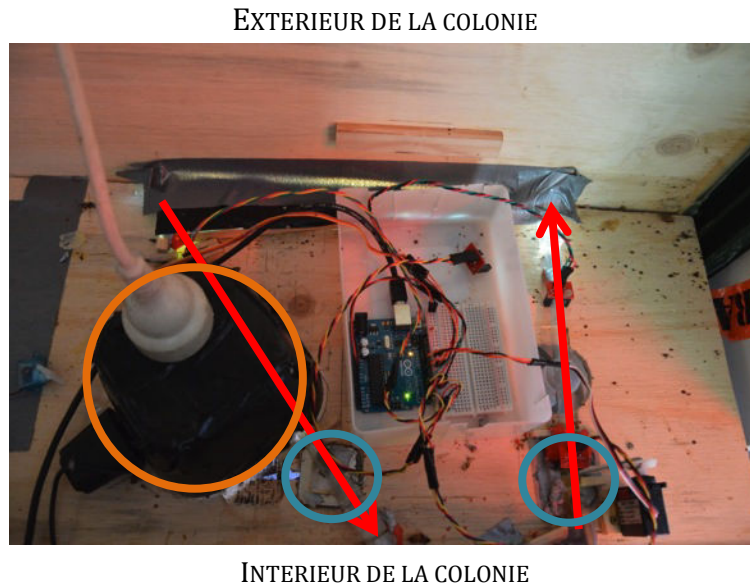


Figure III - 3. Dispositif RFID utilisé dans l'étude du stress immunitaire simple.

Ce dispositif repose sur un accès unique de sortie ou d'entrée dans la colonie (flèches rouges). Chaque accès est équipé d'un système de lecture des transpondeurs (cercles bleus). Le chemin retour à la colonie est également équipé d'un boîtier avec une webcam et une lumière (cercle orange) permettant l'enregistrement par image du passage des abeilles et ainsi la détermination a posteriori de la ressource que l'abeille a collectée (pollen ou non-pollen).

En plus de pouvoir déterminer de manière fiable le temps que les abeilles passent à l'extérieur ou à l'intérieur de la colonie et, avec une adaptation du système, la ressource qu'elles butinent, il est également possible de suivre leur comportement en vol avec des radars harmoniques. Dans tous les cas, ces méthodes permettent de suivre le comportement d'individus exposés à différentes sources de stress. Cela m'a donc permis de suivre l'évolution d'abeilles exposées à un stress immunitaire ou pathologique, en milieu naturel.

Dans ce chapitre je me suis donc attachée à étudier le comportement de dérive, défini comme le fait de se tromper de ruche au retour d'un vol de butinage ou d'orientation, et donc le risque potentiel de transmission de maladies. Ce comportement a été enregistré grâce aux compteurs optiques, chez les abeilles exposées au pathogène *Nosema ceranae* (Article 2). L'effet d'un stress immunitaire simple (identique à celui testé *in vitro*) sur le comportement de butinage (activité et préférence des ressources) a été étudié grâce à un dispositif RFID modifié (Article 3).

II. Impact d'un pathogène sur le comportement de dérive

**Should I stay or should I go:
honeybee drifting behaviour as a function of parasitism
(Article 2)**

Célia Bordier, Maryline Pioz, Didier Crauser,
Yves Le Conte & Cédric Alaux



Apidologie, 2016 : Doi : 10.1007/s13592-016-0475-1

Nest drifting is often observed in honeybees (*Apis mellifera*) and can be detrimental to neighbouring colonies because it has the potential to increase disease transmission. However, the characteristics of drifting behaviour over a honeybee's lifetime and the influence of parasitism on this phenomenon have been insufficiently investigated. Using optical bee counters, we tracked the drifting behaviour of workers that were either infected with the parasite *Nosema ceranae* or uninfected. Approximately 10% of the tracked bees drifted into a foreign colony. The drifting prevalence was influenced by the colony's location in space but not by *N. ceranae* parasitism. However, the number and duration of drifts changed over the lifetime of the bees and the season, and parasitism had an effect on drifters, with *Nosema*-infected bees performing more but shorter drifts. This phenomenon was more pronounced in old bees (+62% and -15% for the number and duration of drifts, respectively) and could potentially be explained by the energetic stress induced by the parasite. In conclusion, combining a detailed analysis of drifting behaviour with the actual risk of newly established disease in colonies will benefit our knowledge of bee epidemiology.

In social insects, individuals usually live in relatively closed societies to ensure that altruistic behaviours are directed towards related nestmates (Wilson 1971). However, drifting behaviour, described as the movement of individuals from their own nest to another, sometimes occurs either as a reproductive strategy or as an accidental phenomenon. On one hand, nest drifting in some eusocial insect species has been shown to represent an alternative reproductive strategy to maximise the drifter's fitness either by contributing to brood raising in several related nests or by directly laying eggs in foreign nests (Neumann et al. 2003; Lopez-Vaamonde et al. 2004; Nanork et al. 2005; Nanork et al. 2007; Sumner et al. 2007; Chapman et al. 2010; Takahashi et al. 2010; Blacher et al. 2013; O'Connor et al. 2013; Zanette et al. 2014). On the other hand, nest drifting can be an accidental phenomenon that is not deliberate but instead is the consequence of orientation errors during orientation or foraging flights, as frequently found in the honeybee, *Apis mellifera* (Free 1958; Pfeiffer and Crailsheim 1998; Neumann et al. 2000).

In the honeybee, nest drifting is believed to be involved in disease transmission between colonies (Neumann et al. 2000; Kralj and Fuchs 2006; Aubert et al. 2008; Kralj and Fuchs 2010). This phenomenon might increase disease transmission risk within apiaries, where the density is high compared to the density found in feral honeybee populations. The occurrence of drifting is often attributed to beekeeping practices (proximity and similarity of hives) as well as a lack of

landmarks (Free 1958; Southwick and Buchmann 1995) and has been reported to vary depending on the season, hive characteristics and bee species (Duranville et al. 1991; Pfeiffer and Crailsheim 1998; Neumann et al. 2000; Paar et al. 2002; Neumann et al. 2003; Forfert et al. 2015). However, the role of parasites in drifting behaviour is not clear.

Because parasites can induce deficits in cognitive capacities and, as a consequence, affect homing ability (Gegear et al. 2006; Iqbal and Mueller 2007; Kralj et al. 2007), a higher occurrence of drifting is expected in infected bees. Nevertheless, Forfert et al. (2015) failed to show an association between the prevalence of drifting and parasitic infection by genotyping individuals from different colonies and determining their initial colony origin. However, deciphering the role of parasites in nest drifting, as well as the consecutive risk of disease transmission between neighbouring colonies, requires a detailed characterization of this behaviour at the individual level. Notably, parasites can also lower the energetic state of individuals, leading to adverse effects on their flight activity (Kralj and Fuchs 2010; Alaux et al. 2014; Naug 2014; Wolf et al. 2014) and likely drifting behaviour.

The aim of the present study was therefore to provide a detailed analysis of drifting behaviour in honeybees over their lifetime and to test whether infection with a parasite could affect the rate, number and duration of nest drifts. We used a monitoring tool (optical bee counter) that was recently developed in our lab to continuously and automatically track the movements of individual bees from a colony to another colony over an extended period of time (Alaux et al. 2014). The influence of parasitism on drifting was determined by differentially infecting workers with the microsporidian *Nosema ceranae*. This parasite is transmitted by the oral route via trophallaxis or ingestion of contaminated comb material and food and develops in the epithelial cell layer of adult workers' midgut. *N. ceranae* can decrease the lifespan of bees (Fries 2010; Higes et al. 2010) and affect their flight activity: infected bees exhibit reduced orientation and homing ability and perform longer foraging trips (Kralj and Fuchs 2010; Alaux et al. 2014; Naug 2014; Wolf et al. 2014). This parasite was first described in the Asian honeybee *Apis cerana* and has been found in samples of the European honeybee *Apis mellifera* since the 1990s (Chen et al. 2008). Although it is not known when this shift in host species occurred, *N. ceranae* is now highly prevalent in European honeybee colonies and exhibits a worldwide distribution (Fries 2010; Higes et al. 2010), suggesting great potential for transmission and epidemiological risk between colonies.

MATERIALS AND METHODS

Experimental setup

Experiments were conducted from April to June 2014 at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Avignon (France). We used colonies that were a mixture of the European subspecies typically used in the southeast of France for beekeeping, principally *Apis mellifera mellifera*.

We recorded the drifting behaviour of bees over their lifetime using 3 hives equipped with optical bee counters. The three hives were placed one metre apart, and one empty hive was placed on either end as a landmark. The day before experimentation, frames with closed brood (at the last pupae stage) were removed from 3 others colonies, placed individually in boxes and kept in an incubator (34°C and 70 % humidity) overnight. The following day, newly emerged bees were collected and mixed to reduce potential colony effects. Half of the bees were artificially infected with *Nosema ceranae* to test the influence of parasitism on drifting behaviour (see below). Each bee was marked with a 3-mm wide tag number printed on laminated paper and glued (Sader ®) onto the thorax. The colour of the tags was specific to each colony (red, blue, and green). For each colony and replicate, the drifting behaviour of 50 control bees not infected with *Nosema* and 50 *Nosema*-infected bees was recorded for 35 consecutive days. The study was performed simultaneously on the 3 hives and was repeated 3 times during the spring (in April, May and June) for a total of 450 control and 450 infected bees.

Nosema infection

Workers from *Nosema*-infected hives were collected to prepare a solution of fresh microsporidian spores. Spores were isolated as described by Higes et al. (2007). Briefly, pools of 10 abdomens were crushed in distilled water, and the suspension was filtered and centrifuged to collect the spores. The spore concentration was determined using a haemocytometer chamber. Following the procedure described in Alaux et al. (2010), *Nosema ceranae* was identified by PCR analysis as the only species present in these bees.

Workers were individually infected on the day of their emergence by feeding with 2 µL of 50% sucrose solution containing 100,000 *Nosema* spores, a dose currently found in naturally infected bees (Meana et al. 2010). To avoid the contamination of control bees, infected and control groups were placed separately in an incubator (34°C, 70 % relative humidity) for 5 hours, which is the time necessary to ingest the solution and to decrease the chance of having exchanges of crop content. The bees were subsequently introduced into the colonies.

To follow the *Nosema* proliferation, 50 additional emerging bees per treatment and colony were paint-marked on the thorax. They originated from the same colony sources than tracked bees,

were introduced with tracked bees, and were collected 9 days after the infection to determine *Nosema* spore levels. Generally, at this age, bees still perform in-hive tasks, and the infection is almost fully developed in the gut (Forsgren and Fries 2010).

Optical bee counter

To follow the individual flight activity of marked bees, we used the optical bee counters described in Alaux et al. (2014). Briefly, this monitoring technology is composed of a modified entrance with eight passages for bees, a camera at the entrance, a computer for image acquisition and software that processes the images and reports the in-and-out activity of bees at the hive entrance (patent number: IDDN.FR.001.140013.000.R.P.2013.000.31235, INRA, 2010). For each detected bee, the software reports its ID (tag number and colour) and direction (whether it is going in or out of the hive), as well as the time of activity (day, hour, minute and second). These data are converted into readable EXCEL files. Each detection is combined with a picture, which allows for verification of the data in case an identification failure is indicated in the EXCEL files.

Drift characterization

In this study, a drift was recorded each time a bee entered a foreign hive, regardless of the time spent inside. Drifts from a foreign colony to another were also considered. Then, we determined the direction (origin and foreign colony), number and duration of drifts for each bee. The two colonies on the end of the row were defined as the edge colonies, and the central colony was defined as the inner colony. The influence of age on drifting behaviour was assayed by dividing the experimental period into three age groups: 1 to 10 days old (young bees), 11 to 20 days old (middle-age bees) and 21 to 35 days old (old bees). The impact of drifting on worker survival was also determined, and the rate of survival was calculated over 35 days using the day of the last record for a specific worker as the day of bee death.

Data analysis

All statistical analyses were performed using the statistical software R version 3.0.2 (R Development Core Team. 2013). The effects of colony position, trial (April, May or June) and treatment on drifting behaviour were analysed using Chi² tests. Whether all drifting bees settled in the host colony was also assessed using Chi² tests. *Nosema* spore levels at 9 days and the impact of treatment on the age of first drift were assessed using Wilcoxon test.

Pseudo-replication occurred in our datasets because *i)* the three colonies were sampled three times and *ii)* a given bee was followed during her lifetime and was able to perform several drifts. Pseudo-replication can lead to erroneous conclusions, such as claiming that an effect of a treatment is real when it is not (Hurlbert 1984). To account for pseudo-replications in our experimental design, the influence of *Nosema* parasitism on drifting behaviour was analysed using mixed models. Models were compared using the small sample size-corrected Akaike's Information Criterion (AICc) (Burnham and Anderson 2004). As recommended by Burnham and Anderson (2002), we considered that two nested models differing by less than 2 AICc points received identical support from the data. In such a situation, the model with fewer parameters was preferred. The probability of drifting for a bee (one drift or more *vs* no drift during its lifetime) was analysed by creating a general linear mixed model (glmer function of the lme4 R package) with a binomial distribution (Bates et al. 2013). *Nosema* infection, trial, and colony position were set as fixed explanatory variables, and colony number was set as the random explanatory variable. The coefficients of this model are the log of the odds-ratios. Variations in the number and duration of drifts per age-class were analysed using linear mixed models with a Gaussian error distribution (lmer function of the lmerTest package) (Kuznetsova et al. 2013). *Nosema* infection, age class, colony position and trial were analysed as fixed factors, whereas bee identity and colony were analysed as random factors. The mean, standard error and confidence interval of each covariable were calculated with the 'predict' function (type = "response") for the first two and with the 'confint' function for the last.

Differences in survival probability between groups (drifting bees *vs* non-drifting bees and control *vs* *Nosema*) were determined using Kaplan-Meier analysis ("survfit" function of the R survival package) (Therneau and Lumley 2014). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Pathological analysis performed on 9-days-old bees showed that *Nosema*-infected bees had significantly more spores than control bees (control: $520,000 \pm 799,249$ spores per bee; *Nosema*-infected bees: $7,575,556 \pm 4,631,973$ spores per bee, Wilcoxon; $W = 1$, $n = 18$, $P < 0.001$).

Drifting activity at the colony level

Of the 900 tracked bees, we obtained information from 839 bees, and 61 bees were never recorded, likely due to early death or loss of tag. In total, flight activity for 422 control and 417 *Nosema*-infected bees was detected at least once. Of these bees, 49 control and 35 parasitized

bees performed drifting behaviour (Table III-1). On average, $9.97 \pm 2.31\%$ of bees drifted ($11.56 \pm 2.05\%$ of control bees and $8.37 \pm 1.25\%$ of *Nosema*-infected bees). We recorded 1,038 drifts, 545 (52.5 %) performed by control bees and 493 (47.5 %) by parasitized bees.

The position of a colony had a major influence on drifting behaviour. The percentage of drifting bees was higher in the inner colony than the edge colonies: 65.3 and 65.7 % from the inner colony for control and parasitized bees, respectively (control: $\chi^2 = 23.31$, $P < 0.001$; parasitized: $\chi^2 = 15.56$, $P < 0.001$). When considering the total number of drifts, the direction of drift was also highly biased, with 65.7 and 70.6 % of drifts performed from the inner colony by the control and *Nosema*-infected bees, respectively (control: $\chi^2 = 282.63$, $P < 0.001$; parasitized: $\chi^2 = 329.90$, $P < 0.001$).

There was no effect of trial time on the percentage of drifting bees (Table III-1). The rate remained constant over the different trials (control: $\chi^2 = 1.15$, $P = 0.56$ and parasitized: $\chi^2 = 0.57$, $P = 0.75$). However, the number of drifts changed over the course of the experiment (control: $\chi^2 = 114.94$, $P < 0.001$; parasitized: $\chi^2 = 6.93$, $P = 0.03$). This change was especially pronounced for control bees, which performed almost 4 times more drifts in April (trial 1) and May (trial 2) than in June (trial 3).

Table III - 1. Drifting characteristics at the colony level and according to parasitism and colony.

	Number of recorded bees		Number and percentage of drifting bees		Number of drifts	
	Control	<i>Nosema</i>	Control	<i>Nosema</i>	Control	<i>Nosema</i>
Colony 1 (edge)	133	138	10 (7.52 %)	6 (4.35 %)	142	30
Colony 2 (inner)	142	142	32 (22.54 %)	23 (16.20 %)	358	348
Colony 3 (edge)	147	137	7 (4.76 %)	6 (4.38 %)	45	115
Trial 1 (April)	145	143	20 (13.79 %)	14 (9.79 %)	233	191
Trial 2 (May)	133	140	13 (9.77 %)	11 (7.86 %)	248	145
Trial 3 (June)	144	134	16 (11.11 %)	10 (7.46 %)	64	157

Drifting activity at the individual level

The percentage of drifting bees that settled in a foreign colony did not differ between the control (49 %) and *Nosema*-parasitized bees (57.1 %) ($\chi^2 = 0.27$, $P = 0.61$). Amongst the bees that did not settle in a foreign colony, the percentage of bees that came back to their initial colony or disappeared was similar between treatments (32.7 % and 18.3 %, respectively, in the control groups, and 25.7 % and 17.2 % in *Nosema* groups; in both treatments: $\chi^2 = 0$, $P = 1$).

Table III - 2. Mixed models fitted to analyze variation in drifting behavior.

Three models were fitted to analyze the drifting probability, the drift numbers and the drift duration. For each model, fixed and random explanatory variables, number of statistical units, degree of freedom (df) and corrected Akaike's information criterion (AICc) are detailed. For each dependent variable, the selected model, i.e., with the lowest AICc, is indicated in bold.

Dependent variables	Fixed explanatory variables	Random explanatory variables	Number of statistical units	df	AICc
Drifting probability	Treatment * Trial + Treatment * Position	Colony	839 bees belonging to 3 colonies	9	520.6
	Treatment * Trial + Position			8	518.6
	Treatment * Position + Trial			7	516.7
	Treatment + Trial + Position			6	514.7
	Trial * Position			7	515.1
	Treatment * Position			5	514.2
	Treatment * Trial			7	526.1
	Trial + Position			5	515.3
	Treatment + Position			4	512.2
	Treatment + Trial			5	522.3
	Position			3	512.9
	Treatment			3	519.8
	Trial			4	522.9
	Null			2	520.4
Drift numbers	Age * Treatment + Age * Position + Trial	Colony/Bee	128 observations of 84 bees belonging to 3 colonies	14	967.1
	Age * Position + Age * Treatment			12	973.7
	Age * Position + Treatment			10	981.1
	Age * Treatment + Position			10	979.3
	Age * Position			9	982.3
	Age + Position			7	987.1
	Age * Treatment			9	980.6
	Age + Treatment			7	988.2
	Age			6	989.5
	Position			5	1003.7
	Treatment			5	1003.9
	Trial			6	999.7
	Null			4	1005.3
	Drift durations			Age * Treatment + Age * Position + Trial	Colony/Bee
Age + Treatment + Age * Position + Trial		12	1575.9		
Age * Treatment + Position + Trial		12	1576.6		
Age * Treatment + Age * Position		12	1582.6		
Age * Treatment + Trial		11	1590.0		
Age * Position + Trial		11	1588.7		
Age		6	1668.4		
Position		5	1684.9		
Treatment		5	1685.3		
Trial		6	1661.6		
Null		4	1698.6		

Drifting probability

The probability of drifting was influenced by the colony position, but there was no effect of *Nosema* parasitism and trial (AICc model selection, Table III-2). Bees from the inner colony tended to drift 3.7 times more often than bees from edge colonies (Table III-3).

Nosema parasitism did not influence the onset age for drifting (Wilcoxon; $W = 774$, $n = 84$, $P = 0.45$). Control and *Nosema*-parasitized bees drifted for the first time when 10.1 ± 5.5 and 10.8 ± 5.1 days old, respectively.

Table III - 3. Estimated coefficients and 95 % confidence interval (CI) of the selected models (see Table III-2) investigating the influence of parasitism, age and colony position on drifting behaviour. NA indicates that there is not enough data to calculate the CI.

Dependent variables	Covariate	Class	Estimated coefficient	Lower 95 % CI	Upper 95 % CI
Drifting probability	Intercept		-2.898	-3.29	-2.54
	Position	Inner	1.472	0.97	1.99
Drift numbers	Intercept		4.659	-1	10.33
	Age	11-20 days	3.028	-4.23	10.34
		21-35 days	8.526	-2.95	19.90
	Treatment	<i>Nosema</i>	-3.739	-10.1	2.57
	Position	Inner	-0.863	-7.08	5.34
	Trial	May	3.888	-1.50	9.24
		June	-1.977	-7.38	3.39
	Age x Treatment	11-20 days x <i>Nosema</i>	4.957	-3.1	12.85
		21-35 days x <i>Nosema</i>	7.404	-4.25	19.21
	Age x Position	11-20 days x Inner	1.219	-7.1	9.35
21-35 days x Inner		-1.030	-13.53	11.53	
Drift durations	Intercept		3355.32	NA	NA
	Age	11-20 days	2253.68	121.8	5,732.40
		21-35 days	-377.08	-1455.48	3,355.65
	Treatment	<i>Nosema</i>	225.53	-169.91	2,560.96
	Position	Inner	1039.20	639.25	3,801.21
	Trial	May	637.69	-811.32	1,651.15
		June	-2885.26	-4090.67	-1,957.29
	Age x Treatment	11-20 days x <i>Nosema</i>	-296.29	NA	NA
		21-35 days x <i>Nosema</i>	-1555.16	-4,001.43	1,178
	Age x Position	11-20 days x Inner	-1473.26	NA	NA
21-35 days x Inner		355.08	-2,881.41	2,843.34	

Drift number over bee lifetime

The model with the lowest AICc was a model that underlined the significant effect of the trial and the age by treatment and age by colony position interactions on the number of drifts (Tables III-2 and III-3). The number of drifts per bee was maximum in May at 10.6 [9.53; 11.7] (mean predicted values with 95 % confidence interval) and minimum in June at 6.1 [5.2; 7]. Overall, the number of drifts was slightly more important in *Nosema*-parasitized bees than in the control groups and increased with age: old bees exhibited more drifts than middle-age bees, which drifted more than young bees. This age-related increase was more important in parasitized bees, with old infected bees performing 62 % more drifts than old control bees (Figure III-4).

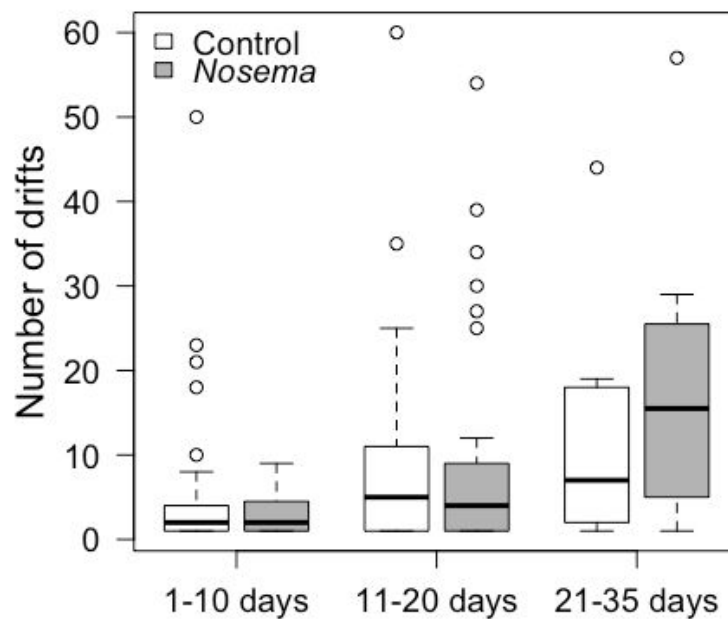


Figure III - 4. Cumulative number of drifts per bee as a function of age and treatment.

The number of drifts cumulated within each age group (1 to 10 days old: n = 34 and 20 for control and infected bees, respectively; 11 to 20 days old: n = 29 and 28; 21 to 35 days old: n = 9 and 8) is shown for all bees in control (non-parasitized) and *Nosema*-parasitized drifting bees. Box plots show the first and third interquartile range with a line denoting the median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which outliers are represented by circles.

Drift duration over bee lifetime

The model with the lowest AICc was the model that underlined the significant effect of the trial and the age by treatment and age by colony position interactions on the duration of drifts (Tables III-2 and III-3). The total drift duration per bee was higher in the second trial (May: 5,686 minutes [5,461; 5,912]) than in the first and third trials (April: 4,718 minutes [4,378; 5,050]; June: 2,034.9 minutes [1,780; 2,289]). Overall, the time spent in a foreign colony was similar between parasitized and control bees (Figure III-5). However, *Nosema* infection caused a decrease in the drift duration in middle-age and old bees. For instance, in the latter age group, *Nosema*-parasitized bees spent 15% less time in a foreign colony during their drift than control bees.

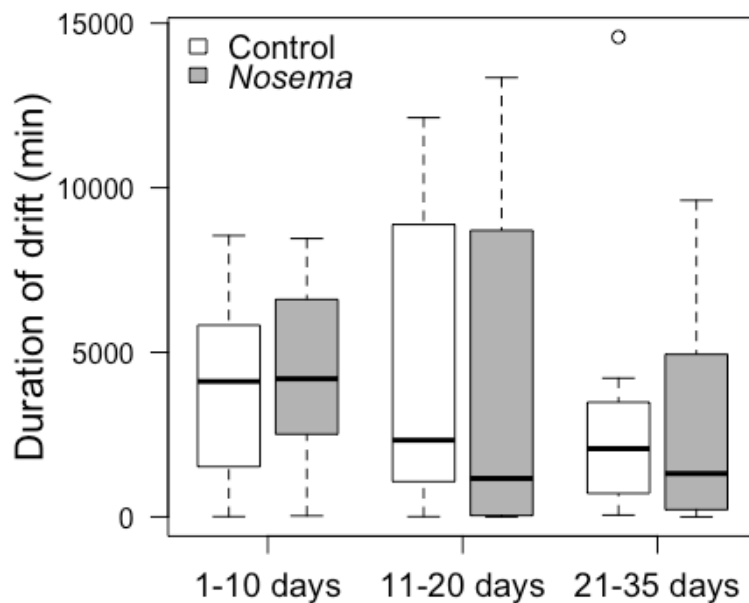


Figure III - 5. Cumulative drift duration per bee as a function of age and treatment.

The duration of drifts cumulated within each age group (1 to 10 days old: n = 21 and 13 for control and infected bees, respectively; 11 to 20 days old: n = 21 and 19; 21 to 35 days old: n = 7 and 7) is shown for all bees in control (non-parasitized) and *Nosema*-parasitized drifting bees. Box plots show the first and third interquartile range with a line denoting the median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which outliers are represented by circles.

Survival

As expected, the survival of *Nosema*-parasitized bees was significantly lower than that of control bees (Kaplan-Meier test, $P = 0.002$). The survival rate of parasitized bees decreased faster than the control, especially after 15 days (Figure III-6).

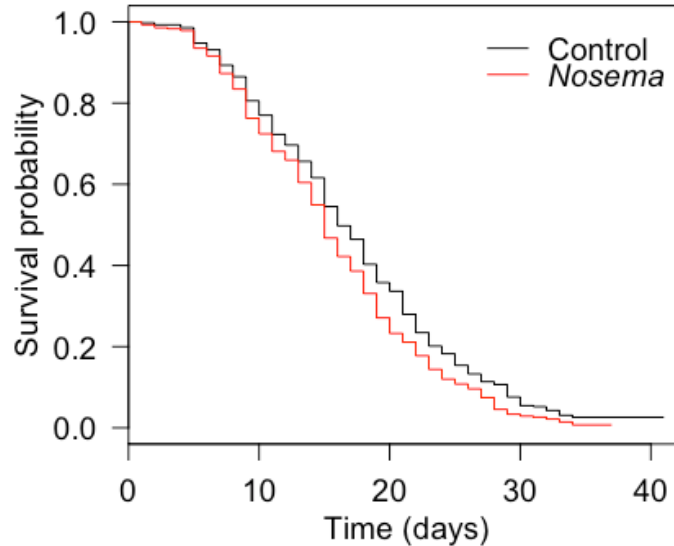


Figure III - 6.Effect of *Nosema* parasitism on bee survival.

Data show the survival over 35 days for control and *Nosema*-parasitized bees (Kaplan-Meier test, $P = 0.002$).

We then tested whether drifting performance affected the survival probability of both control and parasitized bees. The survival probability of drifting and non-drifting bees was similar in both groups (Figure III-7a and b), and no effect of drifting on survival was detected (control: $P = 0.62$; parasitized bees: $P = 0.67$).

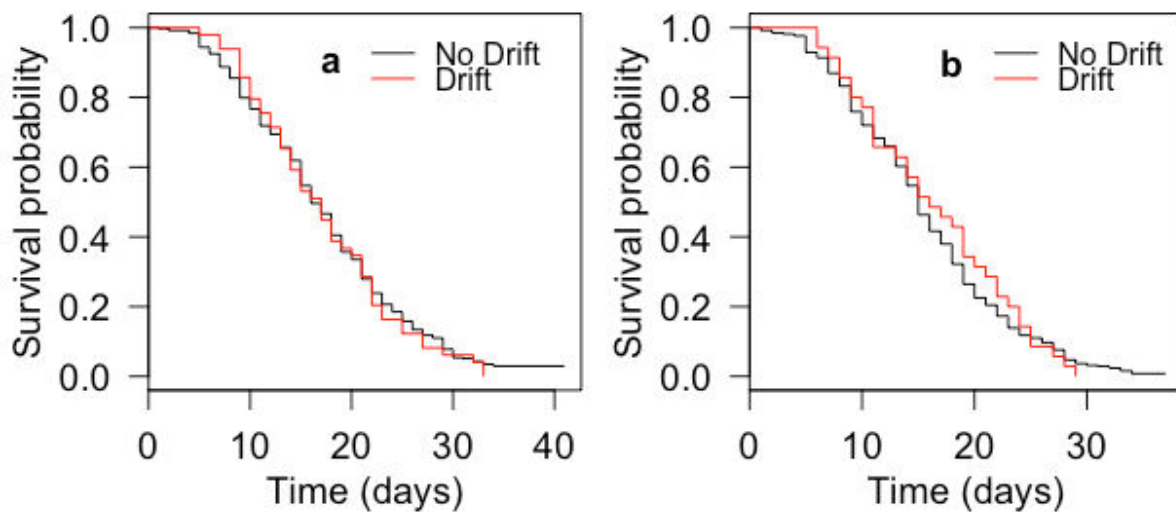


Figure III - 7. Effect of drifting performance on bee survival

Data show the survival of (a) non-drifting and drifting control bees (Kaplan-Meier test, $P = 0.62$), and (b) non-drifting and drifting *Nosema*-parasitized bees (Kaplan-Meier test, $P = 0.67$).

DISCUSSION

For the first time, by recording the in-and-out activity of bees between colonies, we were able to characterize the drifting behaviour of workers, including percentage, number and duration of drifts, throughout their adult lifespan. We were able to test whether drifting behaviour is affected by *Nosema* parasitism. We found, like Forfert et al. (2015), that *Nosema* parasitism did not modify the probability of drifting. However, *Nosema*-parasitized drifters performed more but shorter drifts compared to 'healthy' drifters.

Until now, the study of drifting behaviour in honeybees was limited to punctual observations at the colony level. The optical counter allowed us to follow the drifting dynamic between colonies throughout the life of bees and to record this phenomenon at both the colony and individual levels. At the colony level, our results showed that 9.97 ± 2.31 % of a specific cohort drifted to a foreign colony. This percentage is within the range of previously published data (1 to 18 %) generated via individual genotyping or behavioural observations in European, Asian and African honeybees (Neumann et al. 2000; Paar et al. 2002; Neumann et al. 2003; Forfert et al. 2015). Colony position had a strong influence on drifting; bees drifted more from the inner colony to the edge colonies. This phenomenon is likely due to homogenous and similar landmarks around the inner colonies (Jay 1965; Pfeiffer and Crailsheim 1998; Forfert et al. 2015).

Drifting occurrence is generally attributed to orientation errors in honeybees, but the fact that "only" 10 % of bees drifted suggests that some bees are more prone to orientation errors than others and that this phenomenon doesn't occur randomly. For instance, it is well known that the tendency to perform some behavioural tasks in honeybees is influenced by their genetic and physiological backgrounds (Robinson and Huang 1998). This actually includes drifting since patrines in honeybees can differ greatly in their tendency to drift (Duong and Schneider 2008). It is therefore possible that some patrines exhibit poorer orientation abilities as compared to other ones. Determining the actual behaviour of drifting bees in their new host colony and their physiological background as done in bumblebees and wasps (Sumner et al. 2007; Blacher et al. 2013) would also help to better understand this drifting occurrence: e.g. do drifting bees still perform task activity or are inactive?

We found a seasonal effect on the drifting intensity at the colony level, with control bees performing more drifts during trials 1 and 2 (April-May) than in the trial 3 (June) (Table I). Drifting behaviour is a consequence of orientation errors and also depends on the acceptance-level of the new host colony. Because the experimental design was the same between trials, changes in drifting intensity were likely the result of an increase in colony acceptance. In normal

conditions, only 3.5 % of incoming bees are checked by guard bees, but this permissiveness changes according to season, density of bees and nectar and pollen resources (Butler and Free 1952). For example, the acceptance levels of colonies increase when nectar flow is abundant but decrease during dearth periods (Downs and Ratnieks 2000). In this scenario, changes in drifting intensity should be associated with changes in resource abundance observed in the southeast of France between spring (blooming period, trial 1 and 2) and summer (dry period, trial 3).

At the individual level, we observed an age-related increase in drift number and duration (time inside the foreign colony). The evolution of these parameters is in accordance with the age polyethism of bees (Seeley, 1982), whereby young bees perform brood and nest care but switch to foraging activity (pollen, nectar and water collection) when they get older and thus are more likely to drift. We expected parasites to induce an increase in the propensity to drift, via either host manipulation (Adamo, 2012; Biron and Loxdale 2013) or deleterious effects on the host (e.g. impairment of cognitive functions). Indeed, it would be adaptive for *N. ceranae* to increase the bee propensity to drift and thus its transmission between colonies. Furthermore, the development of *N. ceranae* in bee guts affects the nutritional and energetic balance of bees (Mayack and Naug 2009; Aliferis et al. 2012; Dussaubat et al. 2012), which is expected to impair cognitive ability (Jaumann et al. 2013). However, behavioural (our study) and genetic analysis (Forfert et al. 2015) has demonstrated that drifting is not more prevalent in parasitized bees, although they can affect homing ability (Gegear et al. 2006; Iqbal and Mueller 2007; Kralj et al. 2007; Kralj and Fuchs 2010). A possible explanation is that the deficit in homing ability is not strong enough to increase orientation errors at the colony entrance. A non-mutually exclusive hypothesis is that parasitism reduces the homing success, as indicated by the higher mortality of infected bees, and therefore limits drifting prevalence.

Parasitism had an effect on drifters, with *Nosema*-parasitized bees performing more but shorter drifts. On one hand, the reduction of drift duration might reflect an increase in time spent in the field (Alaux et al. 2014; Naug 2014). The energy shortage induced by *Nosema* infection is suspected to decrease the flight ability of bees (Mayack and Naug 2010) and to result in prolonged resting periods (Wolf et al. 2014). The higher number of drifts could be explained by higher flight activity in *Nosema*-infected bees (Dussaubat et al. 2013) and the occurrence of orientation errors. Finally, the microsporidian parasite reduced, as expected, bee survival (Higes et al. 2007; Alaux et al. 2014), but drifting did not modify bee survival, as found by Pfeiffer and Crailsheim (1998) in one of their two trials. This result was confirmed in both parasitized and control bees, which suggests that drifting does not decrease the bee lifespan and guards have high tolerance for foreign bees, especially parasitized bees.

In conclusion, an average drifting rate of 10 % within an apiary has the potential to influence the transmission of disease between colonies, especially if colonies do not discriminate infected individuals. However, the actual risk of disease transmission into foreign colonies by drifting bees remains to be investigated, as well as whether changes in drifting parameters caused by a parasite (e.g. more but shorter drifts) and seasonal variation can decrease or increase this transmission risk. These data will provide a better understanding of disease development and propagation between and within colonies.

III. Impact d'un stress immunitaire non-pathogénique

Les expérimentations détaillées dans cette partie ont été réalisées dans le Laboratoire de Neuroéthologie Cognitive du Dr Andrew Barron à l'université de Macquarie en Australie, grâce à l'obtention d'une bourse de 'The Compagny of Biologists'. Ces données devraient être valorisées prochainement sous le format d'une communication courte.

Stress decreases pollen forager performance in honeybees (Article 3)

Célia Bordier, Simon Klein, Yves Le Conte,
Cédric Alaux & Andrew Barron

The foraging flights of honeybees are highly energetically demanding and are likely susceptible to energy limitation. We therefore tested whether stressors, which often cause an increase in metabolic demand, can impair foraging performance in honeybees. We showed that a controlled non-pathogenic stressor, which triggers an immune reaction in bees, resulted in a change in the bees foraging preferences. It reduced pollen foraging, and increased the duration of trips in pollen foragers. Stress also lowered the brain level of octopamine in pollen foragers, which is involved in the regulation of foraging and flight behaviour in insects. Flight metabolic rate is higher during pollen foraging than nectar foraging, and nectar gives a higher energetic return relative to the foraging effort when compared to pollen. We propose that stress might be particularly detrimental to the performance of pollen foragers, and stressed bees prefer the energy-rich resource of nectar to compensate for the stress. In conclusion, stress, even at low levels, could have consequences on bee foraging and the nutrient balance of the colony.

Foraging describes the set of processes by which organisms acquire energy and nutrients, whether it is directly consumed or stored for later consumption. It is therefore a major determinant of growth and survival. In honeybees, which are both flying insects and central-place foragers, foraging behaviour places demands on both cognitive capacities (Klein et al., 2017), and metabolic capacity. Indeed, insect flight is known to be among the most intense and energy-demanding physiological process in the animal kingdom (Dudley, 2000). The metabolic rates of flying insects, mainly fuelled by carbohydrates, can be up to 170 times higher than resting individuals (Bartholomew and Casey, 1978). As a consequence, it is expected that environmental stressors, which often impose increased metabolic demands, could compromise foraging performance. Deciphering how stress impacts honeybee foraging performance might help us better understand the mechanisms underlying colony decline and failure often observed around the world (Goulson et al., 2015; Potts et al., 2010).

A first hypothesis is that stress will directly limit bee energy and thus reduce foraging performance (e.g. duration, number of foraging flights). There are several reports of a reduction of global flight activity in parasitized bees due to energy depletion (Kralj and Fuchs 2010; Alaux et al. 2014; Naug 2014; Wolf et al. 2014), but how foraging (resource acquisition) is affected is unknown. Yet another (non-mutually exclusive) hypothesis would be that stress affects forager decision-making processes in response to the energetic challenges of the stressor. In that case, bees may show a preference for resources that can meet their own energetic demands, like nectar which is their main source of carbohydrates. The finding that the gene coding for the pheromone biosynthesis-activating neuropeptide, a neuropeptide known to be higher in nectar foragers than pollen foragers (Brockmann et al., 2009), is over-expressed in parasitized bees (McDonnell et al., 2013), provides some indirect support for this hypothesis. More recently, it has been shown that a parasite can affect the foraging behaviour of infected bees, which are less likely to forage for pollen (Lach et al., 2015). In addition, stress can decrease sucrose responsiveness (Pankiw and Page, 2003), which is higher in pollen foragers than in nectar foragers and empty bees (Pankiw and Page, 2000). Together those results suggest that stressed bees may favour nectar over pollen foraging, which could affect the nutrient balance of the colony.

To test this hypothesis and avoid any potential effects of a parasite manipulation of host metabolism (Adamo, 2012; Biron and Loxdale, 2013), we exposed bees to a non-pathogenic immune-challenge. Immune responses are energetically costly, and even simple responses, like encapsulation, can raise metabolic rate by up to 28 % in insects (Ardia et al., 2012; Freitag et al., 2003). We then recorded their foraging behavior throughout their life with a Radio Frequency

Identification Device (RFID), and a camera at the colony entrance for identifying their loads (pollen vs non-pollen). We expected lower foraging performance and a decrease in pollen foraging in stressed bees. Finally, we assessed the influence of stress on brain biogenic amine signaling, which is known to be involved in the regulation of bee behaviour (Schulz and Robinson, 2001; Schulz et al., 2002).

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed with honeybees (*Apis mellifera*) obtained from the research apiary at Macquarie University (Sydney, Australia). To test the influence of a stress on foraging behaviour (Experiment 1) and brain biogenic amine signalling (Experiment 2), bees were given an immune challenge in the laboratory, tagged and then introduced into hives. Frames containing late-stage pupae were collected from 3 donor colonies and placed into an incubator overnight at 34°C. Newly emerged bees were marked on the thorax with either a RFID tag containing a unique identifier for the experiment 1, or a paint mark for the experiment 2, and released into host colonies. They were then re-captured when 7 days old and placed in plastic cages with *ad libitum* sugar solution (50 %). The immune challenge consisted of piercing the cuticle between the third and the fourth tergites of the abdomen using a 0.15-mm needle. If a haemolymph drop was released after the pin prick, the bee was discarded. Previous studies already showed that bee immune system is activated by this wounding, without pathogen injection (Alaux et al., 2014; Evans et al., 2006; Siede et al., 2012). Control bees did not receive any pin prick. Since some tagged or marked bees may have been missed at the re-captured and therefore not treated, handled bees (control and stress) were given an additional paint mark on the abdomen to identify them by group before release back into their colony. This experiment was repeated 3 times.

Experiment 1: Impact of immune challenge on foraging performance

380 control and 370 stressed bees (n = 3 trials) were released into a small nucleus hive equipped with a RFID reader (Invengo Technology, Shenzhen, China: Perry et al., 2015; Søvik et al., 2015) placed within a modified entrance to monitor each of the entering and exiting channels. For each completed flight, data were recorded in a .csv file reporting the RFID number as well as the date and time when bee left and returned to the hive. A camera and light was placed on the entering channel to record videos. Videos were analysed to determine if bees performed pollen or non-pollen foraging trips. Only data for bees with an RFID tag and paint marks on their abdomen were statistically analysed. Experiments continued until the last

recording of the last bee at 55 days old. Trips shorter than 30 seconds were not considered as foraging flights and were excluded. As in Perry et al. (2015), trip longer than 8h were also removed.

Experiment 2: Impact of immune challenge on brain biogenic amines levels

After the stress exposure at 7 days, 637 control and 695 stressed bees were introduced into a normal Langstroth colony (n = 3 trials). Bees returning to the colony when they were between 24 and 28 days old were sampled and immediately flash-frozen into liquid nitrogen. Whether they carried pollen or not was also noted. Frozen heads were freeze-dried for 60 min at a pressure below 300 mTorr (VirTis Benchtop™) and -35 °C and then stored at -80 °C until brain dissection and biogenic amine analysis. Brain dissections were performed on dry ice. Whole brains included optic lobes, antennal lobes, the central brain and gnathal ganglion.

Biogenic amine quantification

Brain biogenic amine (octopamine -OA-, dopamine -DA-, tyramine -TYR- and serotonin -5-HT-) levels were measured using High-Pressure Liquid Chromatography following the protocol described by Søvik et al. (2013) and also used later (Scheiner et al., 2014; Søvik et al., 2015). Briefly, the HPLC system was composed of a pump and an autosampler (Agilent 1200 Series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), coupled to an electrochemical detector (ESA Coulochem III) connected to an analytical cell (ESA 3011A, Chelmsford, MA, USA). A 100 mm Hypersil BDS octadecylsilane column used to separate samples (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). The signals were integrated using the Chemstation software with reference to a standard curve obtained perchloric acid solutions containing 10 pg/μl of dihydroxybenzylamine and varying amount of OA, DA, TYR, 5-HT, (Sigma-Aldric, St. Louis, MO, USA).

In total, we obtained information on biogenic amine amounts for 94 control bees (32 with pollen and 62 without pollen) and 50 stressed bees (12 with pollen and 38 without pollen). Tyramine was detected in only 14 % of brains, and thus was not analysed.

Statistical analysis

All statistics were performed using the statistical software R version 3.2.1 (R Core Team, 2015). For the RFID experiment, the last day any individual bee was detected was assumed to mark the date of bee death. We then compared the probability of survival between stressed and control

bees. Difference in survival curves were analysed using Kaplan-Meier test ("surfit" function of the survival package on R) (Therneau and Lumley 2014).

Aspects of the foraging performance of bees were analysed using mixed models. The choice of best-fit model was based on the smaller sample size-corrected Akaike's Information Criterion (AICc) (Burnham and Anderson 2004). Variation in total number of completed foraging flights per bee, the collected resource (pollen or not-pollen) and foraging trip duration were each analysed using different mixed models assuming a poisson, binomial and gaussian distribution, respectively. To analyse the number of trips and the collected resource, the treatment (stressed or control) and trial were set as fixed and randomly explanatory variables, respectively. To analyse the foraging trip duration, collected resource and honeybee identification were added as fixed and randomly explanatory variables, respectively.

Biogenic amine amounts were analysed using a repeated measures ANOVA followed by Tukey's post-hoc comparison. Treatment and the resource collected (pollen or not) were analysed as fixed factors while the trial was analysed as random factors.

RESULTS

Experiment 1: Impact of immune challenge on foraging performance

Survival probability

Of the 380 control and 370 stressed bees, a completed flight was recorded at least once from 96 and 72 bees, respectively. The survival probability was not different between bees from the control or immune challenged group (Kaplan-Meier test, $P = 0.43$; Figure III-8).

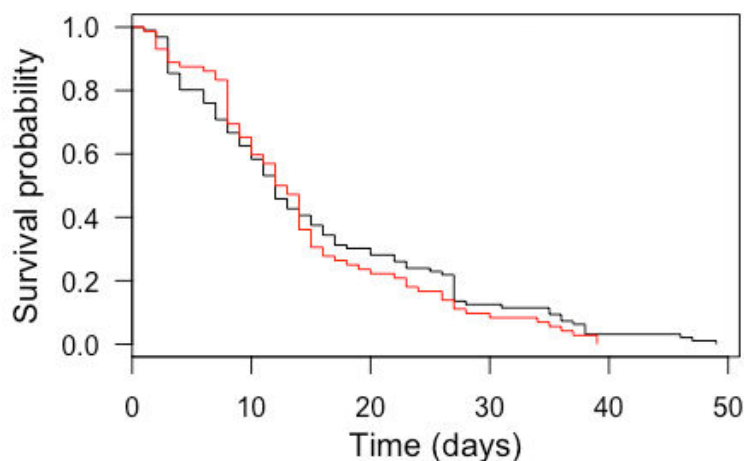


Figure III - 8. Effect of immune challenge on bee 'survival probability'.

Data show the survival over 50 days for control (black) and immune challenged bees (red); day 0 was the day of stress exposure (Kaplan-Meier test, $P = 0.43$).

Number of foraging trips

The best model explaining the variability in the number of trip per bee (lowest AICc) was the one underlining a treatment effect (Table III-1). Stressed bees completed slightly more flights (7.64 [7.19 - 8.09]) (mean predicted values with 95% confidence interval) than control bees (6.03 [5.68 - 6.38]).

Table III - 4. Mixed models fitted to analyse the impact of immune challenge on foraging behaviour. Three models were fitted to analyse the number of foraging, the foraging trip duration and the foraging preference (pollen or not). For each model, fixed and random explanatory variables, number of statistical units, degree of freedom (df) and corrected Akaike's information criterion (AICc) are shown. For each dependent variable, the selected model, i.e., with the lowest AICc, is indicated in bold.

Dependent variables	Fixed explanatory variables	Random explanatory variables	Number of statistical units	df	AICc
Number of foraging	Treatment	Trial	168 bees	3	1757.0
	Null		from 3 trials	2	1772.6
Foraging trip duration	Treatment * Resource	Trial/Bee	956 observations	6	8904.2
	Treatment + Resource		of 168 bees	5	8910.3
	Treatment		from 3 trials	4	8925.5
	Resource			4	8912.2
	Null			3	8927.5
Foraging preference	Treatment	Trial	98 bees	3	115.8
	Null		from 3 trials	2	119.7

Foraging trip duration

For the foraging trip duration, the selected model was the most complex, which underlined a significant effect of the interaction between the treatment and the collected resource (Table III—4). Pollen foraging trips were longer than non-pollen foraging trips (Figure III-9A), but interestingly trip duration for each collected resource was affected by the treatment. Stressed bees performed slightly shorter non-pollen foraging trips than control bees. A larger effect was observed when foraging for pollen: stressed bees performed 20 % longer trips than control bees.

Foraging preference

Regarding the proportion of pollen and non-pollen foraging trips, the selected model highlighted a significant effect of the treatment (Table III-4). Immune challenged bees performed 2.5 times fewer pollen foraging trips (4.83 % [4.52-5.13]) than control bees (12.23 % [11.51-12.95]; Figure III-9B).

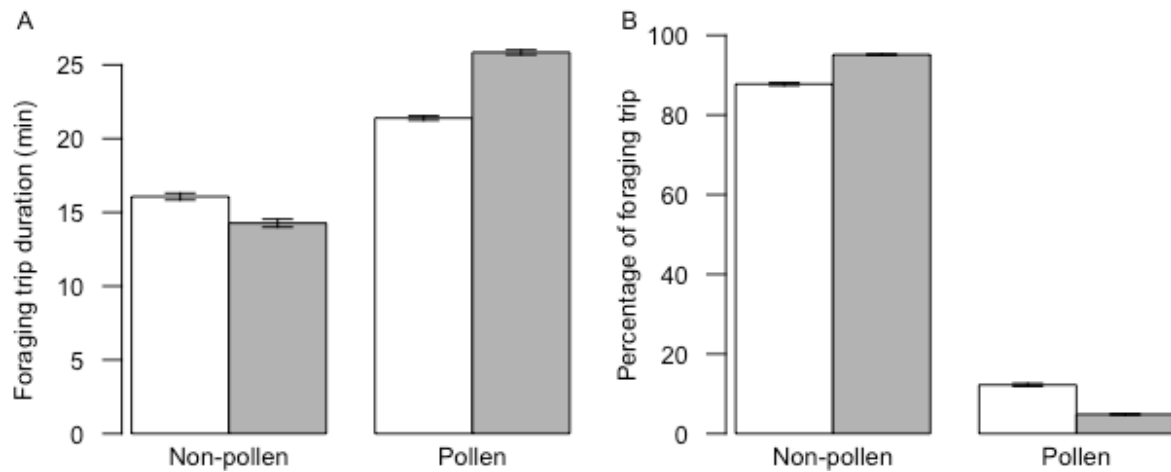


Figure III - 9. Foraging trip characteristics in response to stress.

Data shown the foraging trip duration (A) and the percentage of pollen versus non-pollen foraging trip (B). Mean and 95 % confidence interval predicted by the model are shown according to collected resource and the treatment: control (white bars) and immune stress (grey bars).

Experiment 2: Impact of immune challenge on brain biogenic amines levels

Brain dopamine and serotonin levels did not differ significantly between treatment groups ($P = 0.67$; $P = 0.14$; respectively) or the collected resources ($P = 0.75$; $P = 0.27$; respectively). However, we found a significant treatment by resource interaction on brain octopamine levels ($P = 0.02$; Figure III-10). No difference was found in non-pollen foraging bees ($P = 1$), however regarding pollen foraging, immune stressed bees had significantly less octopamine in the brain than control bees ($P = 0.032$). Pollen foragers, exposed to an immune challenge had around 27 % less octopamine than control bees.

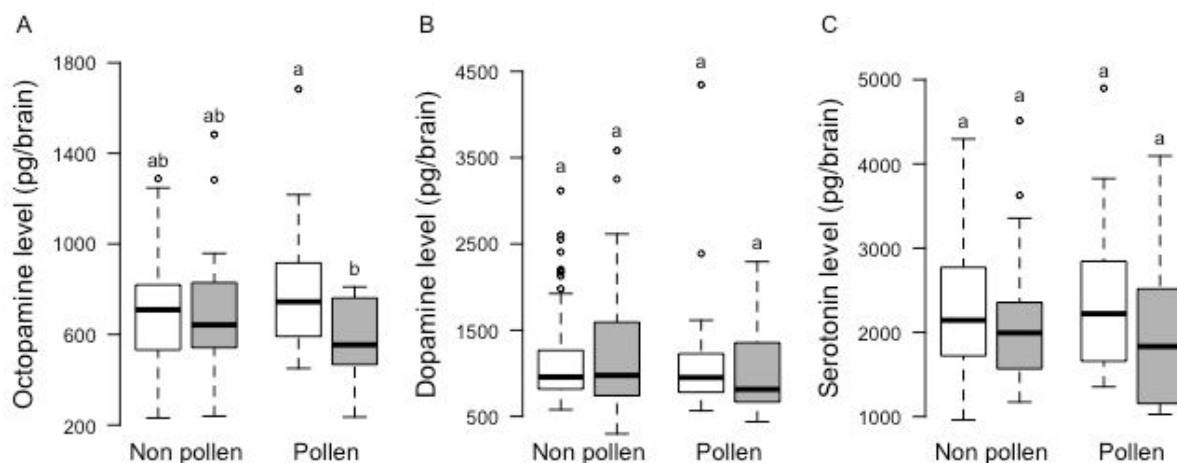


Figure III - 10. Brain biogenic amines levels in response to stress in different forager groups.

The amount of (A) octopamine, (B) dopamine and (C) serotonin is shown for control (white boxes) and stressed bees (grey boxes), and according to the collected resource. Boxes show 1st and 3rd interquartile range with line denoting median. Whiskers encompass 90 % of the individuals, beyond which each outlier is represented by a circle. Plots that do not share a common superscript are statistically different.

DISCUSSION

In this study, we have provided experimental evidence for a stress-induced decrease in pollen-foraging performances in honeybees. The non-pathogenic immune challenge stress applied did not affect bee survival, but did induce a shift in the resource collection effort by the colony. An increase in non-pollen foragers (water foragers, nectar foragers and/or empty bees) was observed at the expenses of pollen foragers. Since more than 90 % of non-pollen foragers are nectar foragers and empty bees (Celia Bordier, personal communication) and those bees have lower sucrose responsiveness than pollen foragers (Pankiw and Page, 2003), we could reasonably assume that stress decreased bee sucrose responsiveness. Stressed bees may prefer to forage for resources that are rich in carbohydrates to overcome the energetic cost of the stress, as has been observed with parasitism (Lach et al., 2015). Indeed, compare to pollen, nectar gives a higher energy return relative to the foraging effort (8:1 gain pollen vs 10:1 gain nectar; Winston, 1987).

Interestingly, pollen foraging trips were 20 % longer for stressed bees, suggesting a significant cost of stress on their foraging capacities. It has been found that the thorax temperature ranks pollen > nectar > water foragers (Feuerbacher et al., 2003). Those differences were linked to the flight metabolic rate, with pollen foragers exhibiting a 10 % higher hovering metabolic rate than nectar foragers, regardless their loads (Feuerbacher et al., 2003). The authors suggested that pollen foragers require more power output to generate the same vertical lift as nectar foragers. It seems that pollen foragers, which have a higher energy requirement, could not overcome the metabolic cost of stress and therefore spent more time in the field due to a decrease in the amount of available energy. It is also possible that metabolic limitations caused cognitive impairment in stressed pollen foragers and thus affected their navigation capacities (Jaumann et al., 2013).

Finally, we found that OA level was depressed in stressed pollen foragers. OA is known to increase sucrose responsiveness in bees (Scheiner et al., 2002) and stimulate flight activity (Fussnecker et al., 2006), and therefore the drop in OA level is in accordance with the behavioural changes observed in pollen foragers after stress exposure: modification of foraging preference and increase in trip duration. These results indicate that OA is as an important mediator of the stress response in honeybees. A previous study reported a quick decrease in OA and DA but not 5-HT levels in response to stress exposure (chilling anesthesia and vertical spin, Chen et al., 2008). However, we did not find variation in DA levels after this stress exposure.

In conclusion, our study suggests that the highly energy-demanding foraging activity of pollen foragers make them susceptible to stress, even at low levels, which could potentially impact the colony nutrient balance (pollen vs nectar). Future studies on whether stress might narrow the colony foraging flexibility to environmental changes might help to better understand colony decline.

IV. Conclusions

Grâce à l'utilisation de méthodes de suivi automatisé, j'ai pu caractériser le comportement des abeilles tout au long de leur vie. Le suivi individuel, replacé dans un contexte social, a permis de caractériser le comportement de dérive d'abeilles infestées par *Nosema ceranae* et d'identifier les préférences de butinage d'abeilles exposées à un stress immunitaire non-pathogénique.

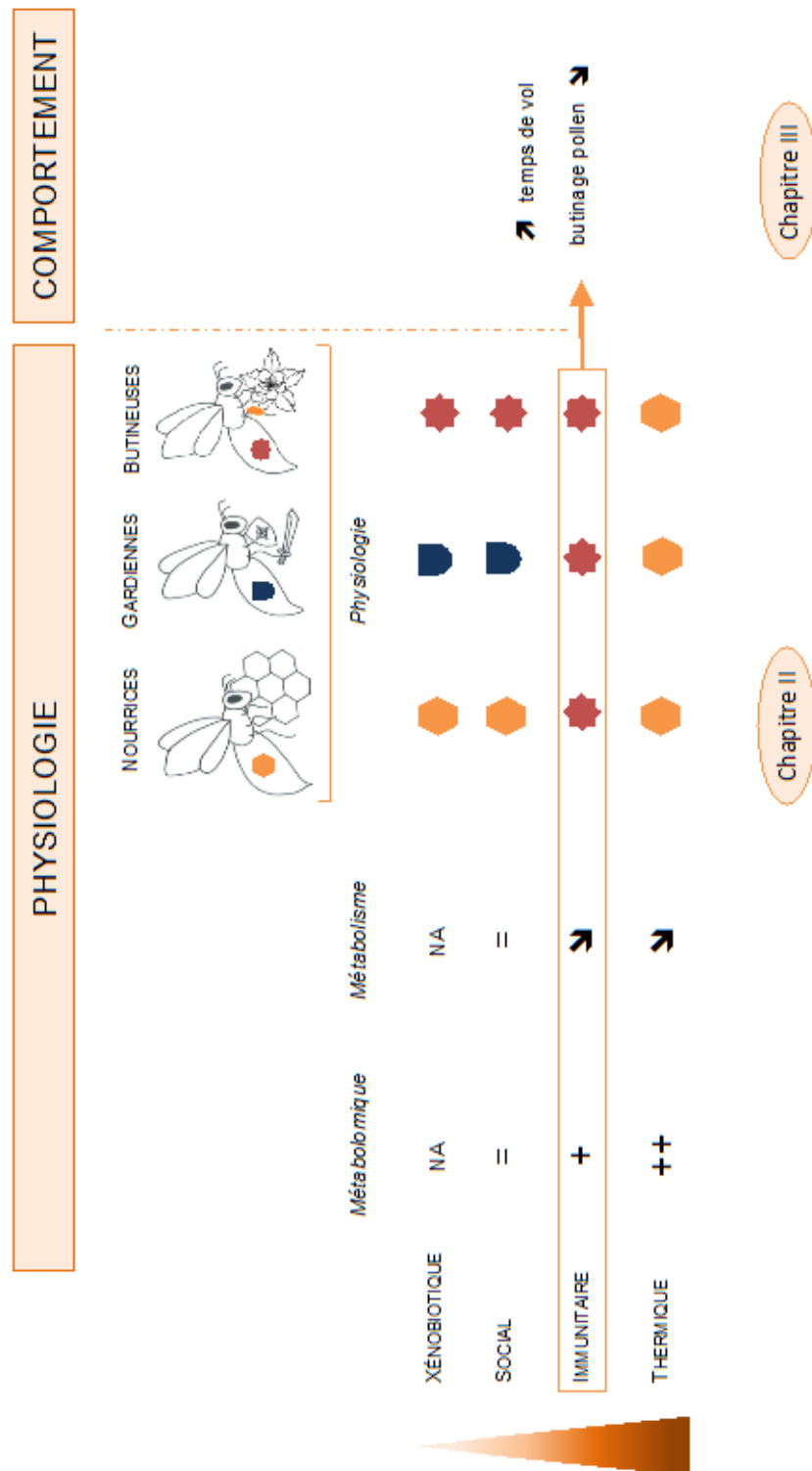
Une diminution des capacités de vol a été observée chez les abeilles stressées, ce qui est probablement dû à une diminution des réserves énergétiques. La diminution du temps de dérive peut refléter une augmentation du temps passé sur le terrain, ce qui est en accord avec de précédentes études (Alaux et al., 2014; D. Naug, 2014). Une augmentation du temps passé sur le terrain a également été enregistrée chez des abeilles stressées collectant du pollen.

Un changement dans les préférences de butinage au dépend de la collecte de pollen a également été observé suite à l'exposition à un stress immunitaire. Cela permettrait aux abeilles d'économiser de l'énergie et/ou de surmonter l'augmentation du coût énergétique liée au stress, en collectant des ressources riches en sucre, d'autant qu'elles peuvent utiliser directement cette ressource pendant leur activité de butinage ou une fois de retour dans leur colonie. À l'échelle de la colonie, la diminution de la collecte de pollen pourrait induire un déséquilibre énergétique.

Grâce à ces deux expérimentations, j'ai montré que des perturbations physiologiques peuvent avoir des conséquences négatives sur le comportement de butinage et affecter l'homéostasie de la colonie, dans le cas où de nombreux individus seraient touchés par un stress immunitaire.

Résumé du Chapitre III :

- Diminution des capacités de vol induite par un stress pathologique
- Diminution de l'efficacité de butinage suite à un stress immunitaire
- Changement dans les préférences de butinage suite à un stress immunitaire



CHAPITRE **IV** ○ ○ ○ ● ○

Réponses comportementales :
Impact d'un stress thermique



I. Avant-propos

Dans un contexte de réchauffement climatique et face à une augmentation, tant en fréquence qu'en intensité, des événements extrêmes comme des vagues de chaleur (Frich et al., 2002), les colonies d'abeilles vont devoir de plus en plus fréquemment déclencher des mécanismes de thermorégulation de manière à assurer le développement d'abeilles viables tant d'un point de vue morphologique que cognitif.

Au niveau physiologique, j'ai observé le développement du profil de nourrice chez les abeilles exposées à une hyperthermie, suggérant un renforcement du soin au couvain. Toutefois, la thermorégulation face à une augmentation de la température environnementale nécessite de collecter et d'évaporer de l'eau au sein de la colonie pour abaisser la température interne. L'augmentation de l'activité globale peut induire un coût énergétique au niveau individuel ainsi qu'à l'échelle de la colonie, par une altération de la collecte de ressources en faveur de l'eau. J'ai donc poursuivi les investigations sur les effets d'une hyperthermie, par la simulation de vagues de chaleur à 37°C (température testée *in vitro*) à l'échelle de la colonie.

L'objectif principal était de : **déterminer si les besoins de thermorégulation ont un impact au niveau individuel et colonial (coût énergétique).**

Sur la base des premiers résultats 2 hypothèses émergent :

- Il existe une inversion du comportement vers des tâches d'intérieur pour optimiser la thermorégulation
- La réorientation du butinage vers la collecte d'eau indispensable pour thermoréguler conduit à un appauvrissement des ressources énergétiques de la colonie

II. Quel est l'impact de vagues de chaleurs sur le comportement de butinage de la colonie

Colony adaptive response to simulated heat waves and consequences at the individual level in honeybees (*Apis mellifera*) (Article 4)

Célia Bordier, Hélène Dechatre, Séverine Suchail, Mathilde Peruzzi,
Samuel Soubeyrand, Maryline Pioz, Michel P  lissier, Didier Crauser
Yves Le Conte & Cédric Alaux



Accept   dans le journal Scientific Reports

Since climate change is expected to bring more severe and frequent extreme weather events such as heat waves, assessing the physiological and behavioural sensitivity of organisms to temperature becomes a priority. We therefore investigated the responses of honeybees, an important insect pollinator, to simulated heat waves (SHW). Honeybees are known to maintain strict brood thermoregulation, but the consequences at the colony and individual levels remain poorly understood. For the first time, we quantified and modelled colony real-time activity and found a 70 % increase in foraging activity with SHW, which was likely due to the recruitment of previously inactive bees. Pollen and nectar foraging was not impacted, but an increase in water foragers was observed at the expense of empty bees. Contrary to individual energetic resources, vitellogenin levels increased with SHW, probably to protect bees against oxidative stress. Finally, though immune functions were not altered, we observed a significant decrease in deformed wing virus loads with SHW. In conclusion, we demonstrated that honeybees could remarkably adapt to heat waves without a cost at the individual level and on resource flow. However, the recruitment of backup foraging forces might be costly by lowering the colony buffering capacity against additional environmental pressures.

Climate change is characterized by an increase in the world mean surface temperature (IPCC, 2014) and has altered the phenology, geographic distribution and population abundance in many species during the past half-century (Parmesan, 2006). However, these phenological and distribution shifts can vary greatly in direction and magnitude depending on the species (Williams and Jackson, 2007; Williams et al., 2007), making it difficult to predict the response of species. Therefore, to better understand the impact of climate change on species, one approach is to integrate the study of biological traits with environmental variation and quantify the physiological and behavioural sensitivity of the organisms to temperature (Kingsolver et al., 2013).

Defining the thermal sensitivity of organisms with a limited ability to regulate their internal body temperature, such as many insects and other ectotherms, is especially important since they are the most likely to respond to climate change. In addition, if outside of tropical areas, they can tolerate winter conditions by entering lethargic stages (ex. diapause), they cannot readily escape from stressful hot summers (Kingsolver et al., 2013). Therefore, they might be susceptible to the increase in climate variability related to climate change, such as heat waves (Frich et al., 2002), which is when the daily maximum temperature exceeds for more than five consecutive days the maximum normal temperature by 5°C (the normal period being 1961-1990 period)(Frich et al., 2002). These heat waves have been reported to severely affect some insect species (increased

mortality) such as flies, butterflies and bees (Franzén and Molander, 2012; Jaco Klok and Chown, 1997; Martinet et al., 2015; Nyamukondiwa et al., 2013), which are vital to supporting natural biodiversity and agroecosystems via pollination services (Gallai et al., 2009). Honeybees, also participating in this ecosystem service, may be affected by heat waves, but due to their social buffering capacities, they are likely less susceptible and more resilient to environmental pressures than other insects (Straub et al., 2015). However, how they adapt and the cost of that adaptation is far from being understood.

In honeybee colonies, brood temperature is strictly controlled within a temperature range of 33 to 36°C (Seeley, 1985), and temperature control is even more precise during the pupal period ($35 \pm 0.5^\circ\text{C}$) (Jones, 2004; Kronenberg and Heller, 1982). Indeed, if adult bees are rather eurytherm, the brood is stenotherm (Seeley, 1985). Maintaining this optimal temperature window is crucial for the colony since extended deviations are known to increase mortality (Koeniger et al., 1978), cause deformities (Himmer, 1932) and affect the synaptic organization in the brain of adults bees (Groh et al., 2004). In addition, pupal developmental temperature can also influence behavioural performances (Jones et al., 2005; Tautz et al., 2003) and specialization (Becher et al., 2009). Though the mechanisms by which environmentally induced changes in temperature are compensated within the colony are well known (endothermic heat production and evaporation of water by wing fanning to warm and cool down the brood, respectively (Kleinhenz et al., 2003; Stabentheiner et al., 2010)), the consequences or costs at the colony and individual levels have been poorly investigated (e.g., alteration of resource foraging, task allocation, energetic resources). Investigating the response to heat waves is notably important since such extreme weather events are expected to increase in frequency and magnitude in the future (Kirtman et al., 2013).

We therefore exposed colonies to simulated heat waves (SHW) (2°C above the optimal temperature of pupal development) and analysed their impact on foraging activity. An increase in water foraging was expected to ensure evaporative cooling of the brood (Lindauer, 1952; Mandl et al., 2004; Southwick and Moritz, 1987), but we assessed whether it occurs at the expense of pollen and nectar foraging therefore decreasing resource income or if it simply involves an increase in global foraging activity without affecting resource income. Next, we determined the impact of simulated heat waves on adult energetic resources (circulating sugar levels and glycogen stores) since an increase in energy mobilization was expected in relation to a higher rate of evaporative cooling and foraging activity. Finally, it is known from previous studies in insects that changes in environmental temperature can affect immune functions (Adamo and Lovett, 2011; Murdock et al., 2012) and can have major effects on host-parasite

interactions by affecting the resistance of hosts to viruses (Frid and Myers, 2002; Kobayashi et al., 1981), bacteria (Lazzaro et al., 2008), microsporidia (Olsen and Hoy, 2002) and fungi (Carruthers et al., 1992; Stacey et al., 2003). We therefore investigated whether SHW modified bee immune systems by quantifying the expression level of genes involved in humoral immunity (apidaecin 1, defensin 1) and cellular immunity (eater) or both (prophenoloxidase-PPO), as well as vitellogenin, which is also involved in bee immunity but has multifunctional roles (protection against oxidative stress, task specialization (Amdam, 2011)). The levels of Deformed Wing Virus (DWV), a highly prevalent and pathogenic virus in honeybees (Baker and Schroeder, 2008), were also determined with bee immune function and following SHW treatments.

METHODS

Experimental setup and heat wave simulation

Experiments were performed during the springs of 2015 and 2016 at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Avignon (France) with hybrid honeybee colonies (a mix of *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera mellifera*). Each year, three colonies of similar size and strength were set in nuclei hives composed of 5 Dadant frames. Hives were placed in an indoor apiary (14 m²) to control their environmental temperature, but were connected to the outside via the entrance, so that bees were free to fly. Each colony originated from a full sized colony that was split in half, and was composed of 3 brood frames and 2 storage frames. The presence of eggs was regularly checked to make sure that the queen was actively laying eggs. During the experiment, colonies did not outgrow their nuclei hives.

The indoor apiary was set at a constant temperature of 23°C for 5 days, followed by 5 days of a daily simulated heat wave (SHW) at 37°C; this temperature is 2°C above the optimal temperature of pupal development and is typically recorded during the summer in the South-East of France (with average minimal temperature of 17°C and regular peaks above 40°C, Artaud, 2017). This temperature jump might represent an extreme scenario, but our goal was to assess whether responding to relatively high temperature induces a cost to the colony (via the need for thermoregulation). To be as realistic as possible with the SHW, the temperature increase was initiated in the morning at 8 am at room temperature, reaching 37°C around noon, and lasting until 8 pm. The overnight temperature was set back to 23°C. We therefore obtained a 'control' temperature treatment of 5 days (SHW-) and 5 days of SHW (with a daily peak at 37°C; SHW+). This 10-day temperature cycle was repeated 3 times.

Temperatures inside each colony were recorded with thermo-tracers (Oceasoftware, $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) placed on a central and storage frame. The temperature was recorded every 5 minutes and recovered using Thermo-Tracer version 3.1 (Oceasoftware).

Colony activity and foraging behaviour (see below) were recorded every day, except for the first day of a new temperature regime for foraging behaviour. To assess the impact of SHW on bee physiology, bees were sampled on the last day of each temperature regime. In addition, we visually estimated the percentage of brood per frame side (capped and uncapped cells) at the end of each period of 5 days to obtain information on colony development. Brood percentages were then converted into number of cells considering a theoretical number of 4,000 brood cells per frame side (personal observation). The influence of SHW on bee physiology and colony activity was assessed in 2015. Variations in foraging activity and brood size were determined in 2016. Each year, all colonies were set up and evaluated at the same time.

Impact of heat waves on colony activity

To assess the flight activity at the colony level, we equipped each colony with an optic bee counter developed in our laboratory (patent IDN.FR.001.130013.000.R.P.2010.000.31235). This device, described in Dussaubat et al. (2013), allows for the continuous recording of the flight activity of all bees at the colony entrance by counting the number of out-going and in-coming bees. The cumulated activity was recorded every 5 minutes and automatically saved in an Excel file with a date and time. A colony of the same size as the indoor colonies was placed in the field next to the indoor apiary and was equipped with an optic bee counter. This colony was used, as an environmental control, to determine whether differences in colony activity could be attributed to variation in field conditions (e.g. climate, resources).

Impact of heat waves on foraging behaviour

For each colony, the proportion of pollen foragers was determined by the manual counting of the number of bees coming back to the colony with or without pollen during a 5-minute period (total of 36,572 bees coming back to the colonies). Next, we sampled bees without pollen for 20 minutes to identify the type of resources they foraged (from 18 to 94 bees per colony and day). We applied dorso-ventral pressure on the abdomen of each sampled bee to make them regurgitate the crop content (Roubik and Buchmann, 1984). Bees that came back with an empty crop were defined as empty bees. When bees regurgitated, the liquid was collected with 10 or 20 μL microcapillary tubes (Hirschmann®, Ringcaps®). To determine the volume, the liquid height was measured in millimetres and converted into microliters. The concentration of sugar in the

liquid was measured, as a percentage of saccharose equivalent, using manual refractometers (Bellingham & Stanley Ltd, Tunbridge Wells, UK: 0-50 °Brix and 45-80 °Brix). As in Reetz et al. (2012), bees were identified as water and nectar foragers when the saccharose concentration of the crop content was below or above 15 %, respectively.

The foraging behaviour of bees (pollen, nectar and water foragers) was assessed 3 times each afternoon on the 3 colonies (colonies were analysed serially each time and order was randomized each day), and we obtained a total of 5,719 sampled bees.

Impact of heat waves on bee physiology

Energetic resources

The impact of heat waves on energetic resources was assessed by quantifying glycogen reserves and circulating carbohydrate levels (glucose, trehalose and fructose) in bees. Bees were sampled on both brood and storage frames (containing pollen and honey). Haemolymph sampling was performed immediately after bee collection. For that purpose, we pricked bees between the third and fourth tergite with a needle and collected 3 to 5 µL of haemolymph with microcapillary tubes (Ringcaps®). Whole bees and haemolymph samples were stored at -20°C. We analysed 6 bees per colony and replicate, giving a final sample size of 54 bees per temperature condition and type of frame.

The glycogen level in the whole bee was quantified by spectrophotometry using the Glucose RTU™ method (BioMérieux SA) as described in Bordier et al. (2017). Briefly, the absorbance was determined at 505 nm, and the amount of glucose was calculated from a standard curve obtained from serial dilutions of pure glucose treated within the same conditions.

The haemolymph sugar levels were quantified for each bee by high-pressure ion chromatography (HPIC) Dionex ICS-3000 following the protocol described by Rusch et al. (2013). The curves of sugars were obtained for trehalose, glucose, and fructose. For the post chromatography analysis, peaks areas were converted into sugar concentrations.

Immune gene expression and DWV loads

To have an overview at the colony level of physiological changes, bees were sampled on brood frames (containing bees from all successive age classes). Bees were sampled on brood frames and immediately stored at -80°C. We analysed 3 pools of 10 bees per colony and replicate, giving a final sample size of 27 pools per temperature condition. Analyses were performed on abdomens since antimicrobial peptides and vitellogenin are mainly synthesized in the abdominal fat body. Total RNA was extracted from the abdomens by homogenizing them in 900 µL of Qiazol reagent (Qiagen). To quantify the gene expression and DWV loads in each pool of bees, RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR were conducted using the protocol described in

Di Pasquale et al. (2013). Cycle threshold values of vitellogenin, apidaecin 1, defensin 1, eater, and prophenoloxidase were normalized to the geometric mean of the housekeeping gene actin and eIF3-S8 using the comparative quantification method (delta Ct method) for genes. Those housekeeping genes were previously found to remain unchanged upon heat stress (Bordier et al., 2017). For DWV, external standards of known concentration were obtained from 10-fold serial dilutions and used for absolute quantification. Non-template controls were also included on each plate. Primer sequences are reported in Table IV-1.

Table IV - 1. Primer pairs used for quantitative PCR of honeybee genes and virus.

Locus	Identifier	Forward primer	Reverse primer	Reference
Actin	GB17681	TGC CAA CAC TGT CCT TTC TG	AGA ATT GAC CCA CCA ATC CA	Amdam et al., 2004
Apidaecin 1	GB47546	TTT TGC CTT AGC AAT TCT TGT TG	GTA GGT CGA GTA GGC GGA TCT	Gregorc et al., 2012
Defensin 1	GB19392	TGC GCT GCT AAC TGT CTC AG	AAT GGC ACT TAA CCG AAA CG	Gregorc et al., 2012
Eater	GB50508	CAT TTG CCA ACC TGT TTG T	ATC CAT TGG TGC AAT TTG G	Simone et al., 2009
eIF3-S8	GB12747	TGA GTG TCT GCT ATG GAT TGC AA	TCG CGG CTC GTG GTA AA	Ament et al., 2011
PPO	GB43738	AGA TGG CAT GCA TTT GTT GA	CCA CGC TCG TCT TCT TTA GG	Evans, 2006
Vitellogenin	GB13999	TTG ACC AAG ACA AGC GGA ACT	AAG GTT CGA ATT AAC GAT GAA	Fischer and Grozinger, 2008
DWV	AY224602	TTC ATT AAA GCC ACC TGG AAC ATC	TTT CCT CAT TAA CTG TGT CGT TGA	Locke et al., 2012

Statistical analysis

All statistics were performed using the statistical software R version 3.2.1 (R Development Core Team., 2015).

The activity of the colony was measured across time by the number of exits N_t between times $t-1$ and t , which are separated by a time lag of 5 minutes. The number of exits was modelled by the following autoregressive conditional Poisson model:

$$(1) N_t \sim \text{Poisson}(\alpha + \beta N_{t-1} + \gamma_1(d_t, t) + \gamma_2(d_t, t)),$$

where α is a basic number of exits, βN_{t-1} is an auto-correlation term, $\gamma_1(d_t, t)$ is an additional morning effect at day d_t (this effect applies only if t belongs to the period [8:00-12:00] of day d_t) and $\gamma_2(d_t, t)$ is an additional afternoon effect at day d_t (this effect applies only if t belongs to the period [12:00-20:00] of day d_t). More precisely, the basic number of exits α is defined as the expected number of exits if $N_{t-1} = 0$ and t is outside the period [8:00-20:00], $\alpha + \gamma_1(d_t, t)$ is the

expected number of exits if $N_{t-1} = 0$ and t belongs to the period [8:00-12:00], and $\alpha + \gamma_2(d_t, t)$ is the expected number of exits if $N_{t-1} = 0$ and t belongs to the period [12:00-20:00]. However, since N_{t-1} is not 0 in general, the expected number of exits is the sum of (i) either α , $\alpha + \gamma_1(d_t, t)$ or $\alpha + \gamma_2(d_t, t)$, depending on the period during the day and (ii) the auto-correlation term βN_{t-1} . In the model, the term βN_{t-1} reflects, in terms of number of exits, the inertia of the activity of the colony (how the number of exits N_t is affected by the number of exits at $t-1$), whereas the variation in the terms $\gamma_1(d_t, t)$ and $\gamma_2(d_t, t)$ provides information about the responses of the colony to changes in environmental factors (computed number of exits every 5 min. in the morning and afternoon, respectively). The model was fitted to each time series of the numbers of exits using the 'tsglm' function in the R package tscount. For each colony, the fitting process yield estimates for α , β , for each monitoring day d_t , and the morning and afternoon effects, $\gamma_1(d_t)$ and $\gamma_2(d_t)$, respectively, were evaluated. Here, the trial effect (set of 5 consecutive days under the same thermal condition) is embedded in the day effect.

Variations in the proportion of forager types (pollen, nectar, water and empty) were analysed using a generalized linear mixed model with a binomial distribution. The model with the lowest sample size-corrected Akaike's Information Criterion was selected. The temperature treatment was analysed as a fixed factor, whereas colony and a nested effect with run, day and trial were analysed as random factors. The term run defines the sampling order within each afternoon (run 1, 2, 3) and the term day corresponds to the day number after the beginning of treatment (SHW+ and SHW-) within a trial (day 2, 3, 4 and 5).

Variation in nectar parameters (volume, concentration and quantity of sugar), physiological parameters (gene expression, sugar and glycogen levels) and brood size were analysed using repeated measures ANOVA followed by Tukey's post hoc comparison. Treatments and sampling frames were analysed as fixed factors, whereas the replicate and colony origin were analysed as random factors. The link between vitellogenin and DWV was analysed using Pearson's correlation test.

RESULTS

Thermoregulation

The temperatures recorded on storage frames varied greatly (from 30 to 37°C) and according to the cycle of temperature regimes (Figure IV-1), showing that colonies felt the SHW. The temperature recorded on the central frame of colony 1 showed minimal variation (approximately 35°C). This was due to the presence of the brood near the temperature sensor, and therefore, an effective brood thermoregulation was maintained regardless of the temperature treatment. The temperatures in colony 2 and 3 central frames exhibited greater variation according to the SHW cycles (no brood near the temperature sensor). Brood size, which was estimated to $11,428 \pm 2,698$ brood cells per colony during the experimental period, remained stable and was not impacted by the exposition to SHW ($P = 0.26$).

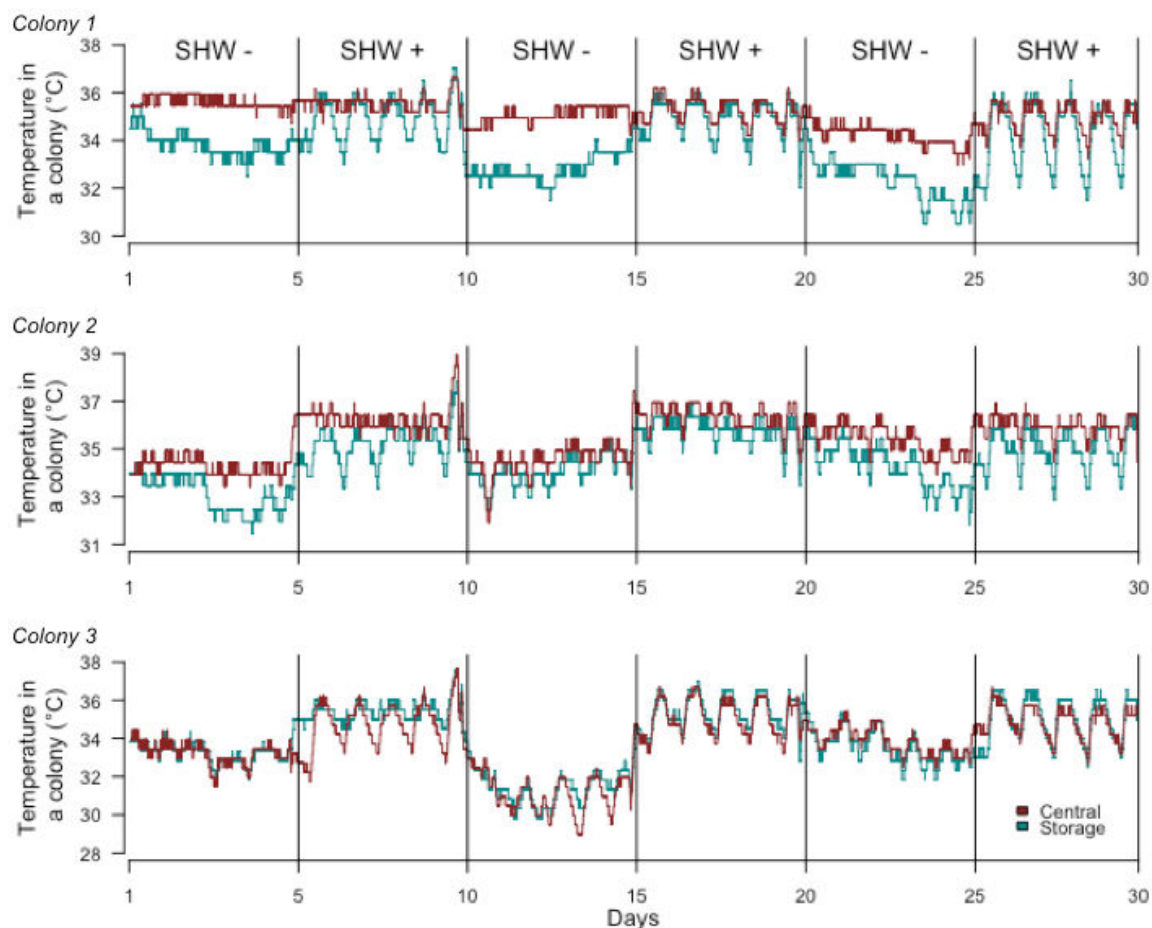


Figure IV - 1. Variations in colony temperature.

Temperature recorded on central (red) and storage frames (blue) in each colony. Temperature (°C) was recorded on frames over the successive periods of the SHW treatments by using thermo-tracers. In colony 1, the temperature sensor on the central frame was near the brood. However, in colonies 2 and 3 the brood changed position over time (adult emergence, egg-laying on others frames or away from the temperature sensor), which explains the lack of thermoregulation near the temperature sensors.

Impact of heat waves on colony activity

The model for the temporal dynamics of the number of exits was fitted to time series collected from colonies exposed to SHW and from the environmental control colony. We obtained a satisfactory goodness-of-fit (the coefficient of variation R^2 ranges from 0.95 to 0.97 for the 4 colonies; see also Figure IV-2, which shows that the observed time series and the predicted time series closely overlap).

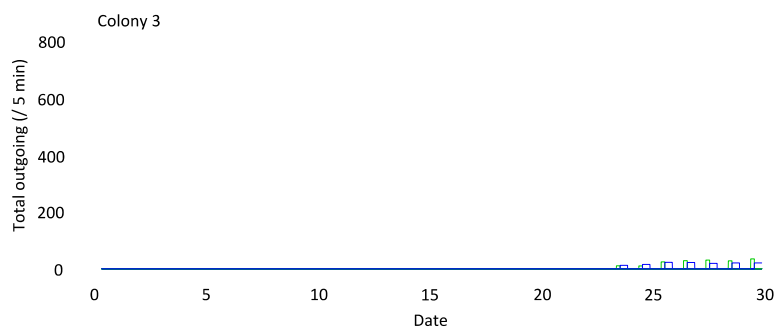
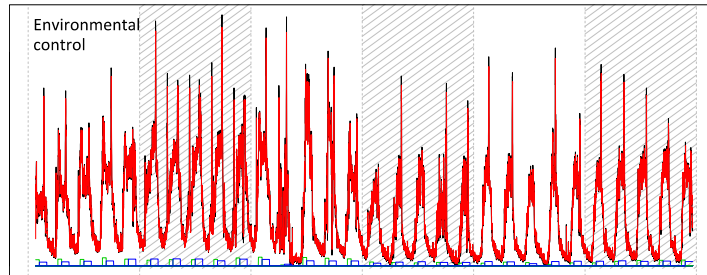


Figure IV - 2. Fit of the autoregressive conditional Poisson model to the time series. Data are shown for the environmental control colony and for the colonies exposed to SHW (Colonies 1, 2 and 3). Black curve is the observed number of exits. Red curve is the predicted number of exits. Green curve represents the morning effects. Blue curve represents the afternoon effects. Hatched periods are 5-day periods with simulated heat waves for colonies exposed to the temperature treatment.

The basic number of exits α (computed number of exits outside the period [8:00-20:00]) was rather low (from approximately 1 to 6 exits every 5 minutes, Table 1), and even though there was a difference between the control and treated colonies, this difference was negligible compared to the average number of exits observed over the course of the experiment (approximately 160 exits every 5 minutes, supplementary Fig. S1). The auto-correlation coefficient β (inertia of the colony activity) was consistent over the four series (Table 1), indicating a similar dynamic between colonies. Its high estimated value (approximately 0.93) showed that the inertia of the colony activity was rather high.

Table IV - 2. Estimates of basic number of exits (α) and auto-correlation parameter (β) from the autoregressive conditional Poisson model.

The α and β parameters were indicated with their standard errors and lower and upper bounds of their confidence intervals at 95 % for each colony.

Colony	Parameter	Estimate	Std. Error	CI(lower)	CI(upper)
Environmental control	α	5.94	0.14	5.66	6.21
	β	0.924	0.002	0.921	0.928
Colony 1	α	1.44	0.04	1.36	1.52
	β	0.928	0.002	0.924	0.932
Colony 2	α	2.10	0.06	1.98	2.21
	β	0.933	0.002	0.929	0.937
Colony 3	α	1.44	0.04	1.36	1.52
	β	0.936	0.002	0.932	0.940

Regarding the SHW influence on flight activity, we found that morning ($\gamma_1(d_t, t)$) and afternoon ($\gamma_2(d_t, t)$) effects range from 3 to 45 exits over 5 minutes (mean = 17.7; Figure IV-3) and represents 11 % of the average number of exits. For colonies exposed to the temperature treatment, the afternoon effects are larger during SHW compared to periods without SHW (large dots above large circles). As opposed to the afternoon, no consistent change according to SHW treatment was observed in the colony activity in the morning. Thus, the temperature treatment induced an increase in the colony activity in the afternoon. In addition, jumps between successive 5-day periods were large and consistent for colonies exposed to the temperature treatment (mean jump = 12.6 ± 0.6) compared to the environmental control colony (mean jump = 7.4 ± 1.6). Thus, the temperature treatment induced larger perturbations in the colony activity.

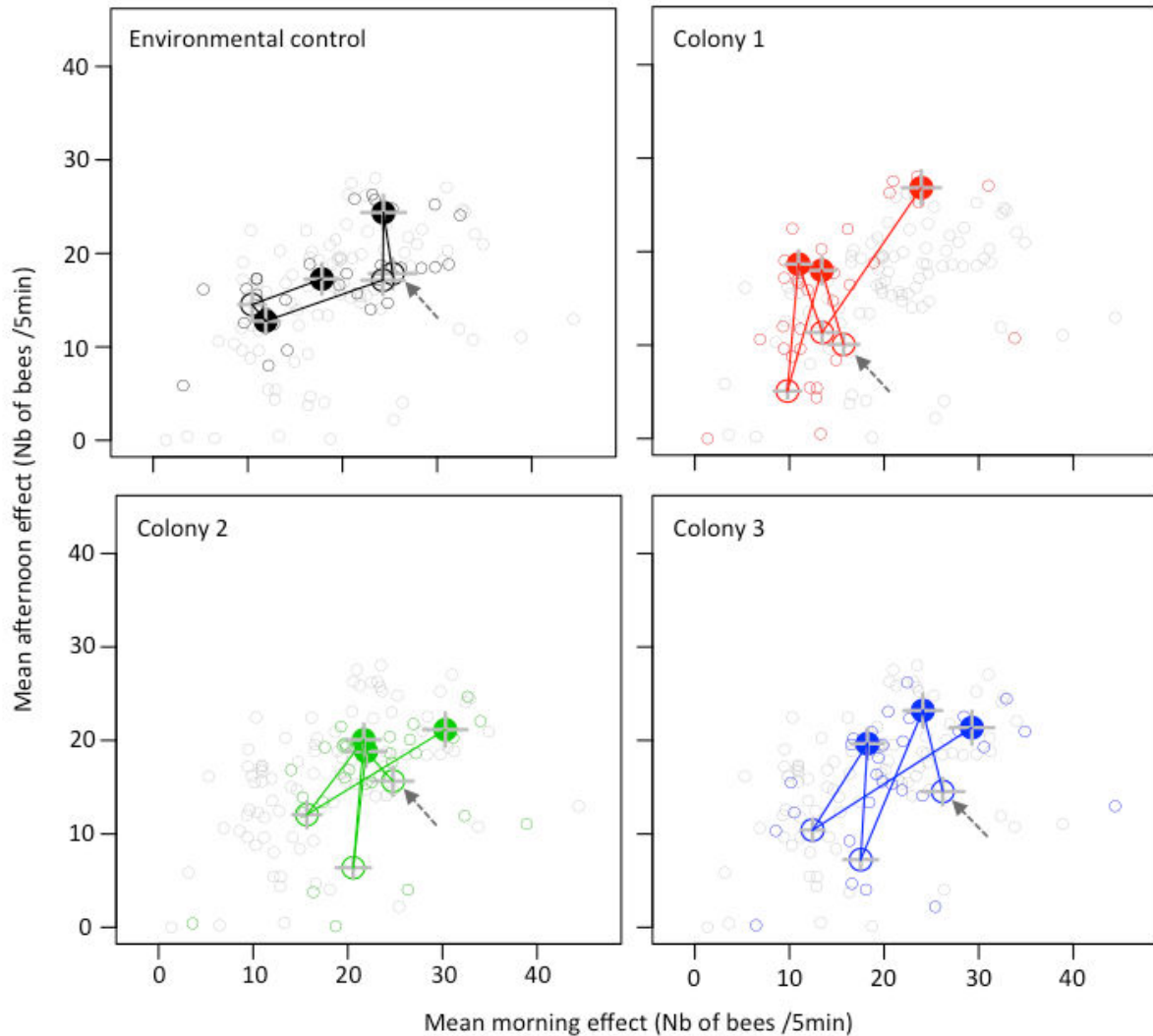


Figure IV - 3. Mean morning effects versus mean afternoon effects estimated from the autoregressive conditional Poisson model.

Each small circle gives the morning effect (abscissa) and the afternoon effect (ordinate) estimated for a specific day and colony (the axes' unit is the number of exits per 5 min). In each panel, small coloured circles (in black, red, green or blue, depending on the panel) correspond to daily morning and afternoon effects of the colony of interest, whereas grey small circles correspond to daily morning and afternoon effects of the three other colonies. In each panel, large circles represent the average effects of the colony of interest for 5-day periods without SHW. Large dots represent the average effects for 5-day periods with SHW. Lines linking the large circles and dots represent jumps from a 5-day period to the following 5-days period. Arrows indicate the first 5-day periods of the experiment without SHW (large circle), which is followed by a 5-day periods with SHW (large dot) and so on. For experimental colonies, large dots (SHW+ periods) were consistently above large circles (SHW- periods), showing an increase in colony activity under SHW in the afternoon.

Impact of heat waves on foraging behaviour

Regarding the proportion of pollen foragers, the model with the lowest AICc was a null model (model without an explicative variable; null model: 1464.2; model with SHW: 1466.3), indicating that SHW exposure did not impact pollen foraging at the colony level (Figure IV-4A).

Regarding the proportion of regurgitating bees, the selected model underlined a significant effect of the treatment with an increase of 15.58 % in regurgitating bees during SHW (null model: 1143.2; model with SHW: 1116.5; Figure IV-4B). When considering the proportion of water foragers, the model with the lowest AICc underlined an impact of SHW; the proportion of water foragers doubled with SHW exposure (null model: 1013.8; model with SHW: 993.1; Figure IV-4B). For nectar foragers, the null model was selected, indicating no impact of SHW on the proportion of nectar foragers (null model: 1284.5; model with SHW: 1286.6). However, SHW induced significant changes in the volume and the concentration of collected nectar. On one hand, the volume of nectar collected by bees slightly increased with SHW treatments (9.47 ± 0.16 and 10.03 ± 0.17 μL before and after SHW, respectively ($P < 0.001$)), but on the other hand, the saccharose concentration decreased (43.19 ± 0.28 and 38.74 ± 0.25 % before and after SHW, respectively ($P < 0.001$)). Overall, the amount of collected sugar per bee did not change with SHW treatment (4.10 ± 0.07 μg and 3.92 ± 0.07 μg before and after SHW, respectively ($P = 0.29$)).

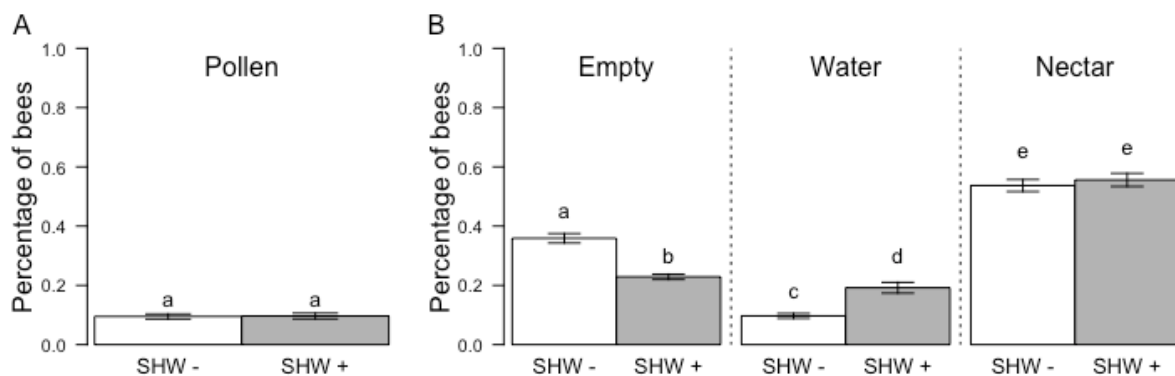


Figure IV - 4. Proportion of pollen, nectar, water foragers and empty bees according to the SHW treatments.

The mean percentage and standard error of bees foraging pollen (A) and other resources (B) are shown for bees sampled during an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars). For each forager category, different letters indicate significant differences (GLMM).

Impact of heat waves on bee physiology

Energetic resources

A significant difference in total circulating sugar levels was found between bees sampled on brood and storage frames (bees on storage frames had a higher sugar level than bees sampled on brood frames, $P < 0.001$; Figure IV-5).

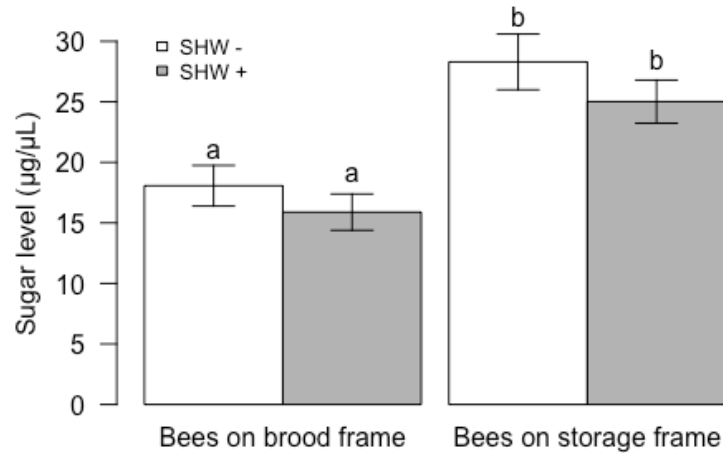


Figure IV - 5. Haemolymph sugar levels according to the SHW treatments.

Mean and standard error of sugar levels ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in bees sampled at the end of an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars) ($n = 53\text{-}54$ bees per conditions). The sugar level was higher in bees sampled on storage frames than on brood frames ($P < 0.001$) but was not affected by SHW ($P = 0.17$). Different letters indicate significant differences (ANOVA).

This change was demonstrated by 2x higher levels of glucose and fructose in bees sampled on storage frames, while the trehalose level remained unchanged (Figure IV-6). However, SHW did not affect total and individual sugar levels in haemolymph ($P > 0.08$ for total and individual sugar levels).

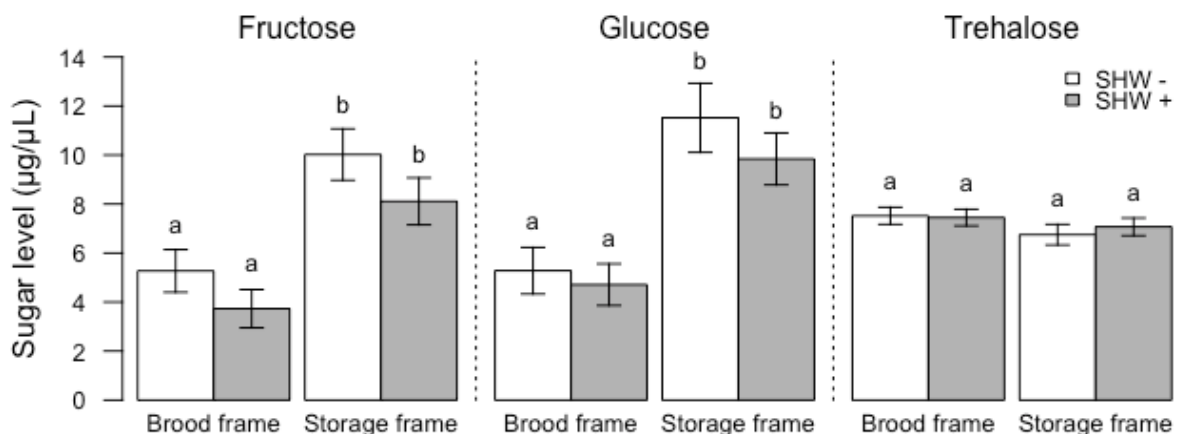


Figure IV - 6. Fructose, glucose and trehalose levels in bee haemolymph.

Mean and standard error of fructose, glucose and trehalose levels ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in bees sampled on brood frames or storage frames at the end of an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars) ($n = 53\text{-}54$ bees per conditions). For each sugar, different letters indicate significant differences between each group (ANOVA).

Similarly, glycogen levels were significantly higher in bees sampled on storage frames than in bees sampled on brood frames ($P < 0.001$, Figure IV-7). A significant effect of SHW on glycogen level was also detected ($P = 0.032$), as well as an interaction between the SHW treatment and the sampled frames ($P = 0.014$). Though glycogen levels did not change with SHW in bees sampled on brood frames ($P = 0.99$), it significantly increased in bees sampled on storage frames ($P = 0.007$).

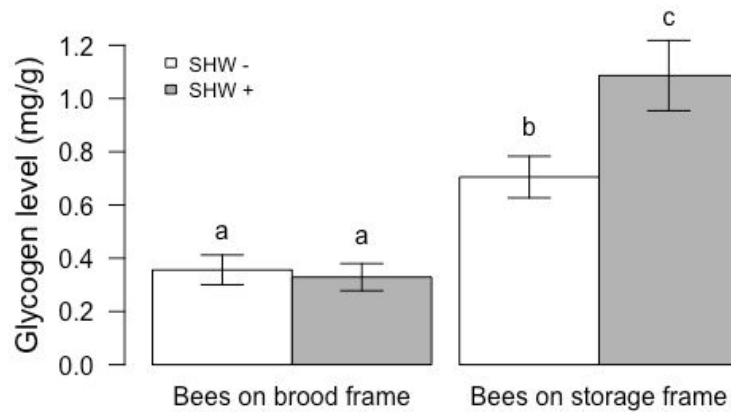


Figure IV - 7. Glycogen levels in whole bees according to the SHW treatments.

Mean and standard error of glycogen levels (mg/g) in bees sampled at the end of an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars) ($n = 53-54$ bees per conditions). The glycogen level was higher in bees sampled on storage frames than on brood frames ($P < 0.001$) and increased with SHW for bees sampled on storage frames ($P = 0.007$). Different letters indicate significant differences (ANOVA followed by Tukey's post hoc comparisons).

Immune gene expression and DWV loads

The gene expression levels of apidaecin 1, defensin 1, eater and prophenoloxidase were not affected by SHW ($P > 0.17$ for all genes; Figure IV-8). However, vitellogenin expression levels significantly increased with SHW treatment ($P < 0.001$; Figure IV-8 and Figure IV-9).

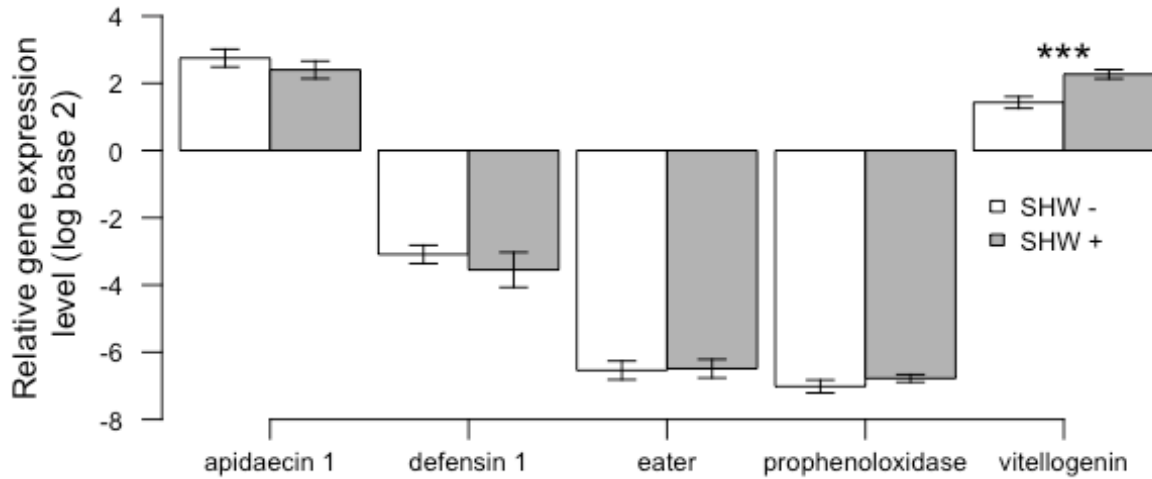


Figure IV - 8. Gene expression levels according to the SHW treatments.

Mean and standard error of relative gene expression levels of apidaecin 1, defensin 1, eater, prophenoloxidase and vitellogenin in bees sampled at the end of an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars) ($n = 27$ pool of bees per treatment). Significant differences between groups are indicated (***: $P < 0.001$, ANOVA).

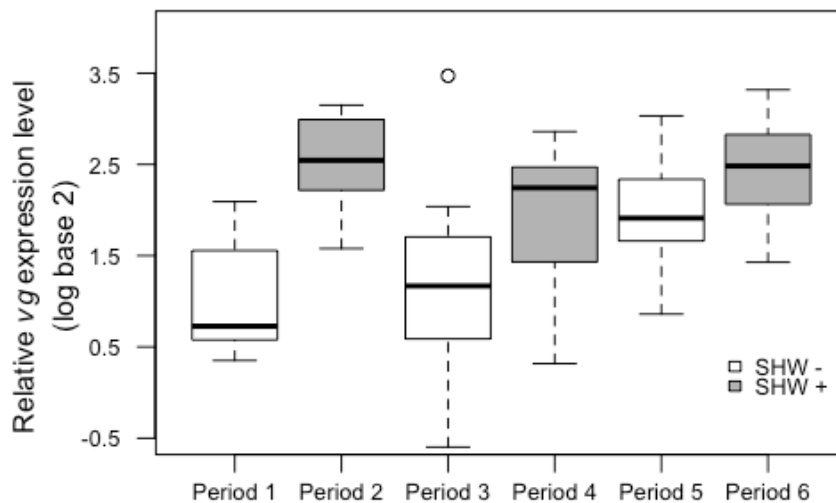


Figure IV - 9. Vitellogenin expression levels over the successive SHW periods.

Data are shown according to the SHW treatment in bees sampled at the end of an SHW- (white boxes) or SHW+ period (grey boxes) ($n = 9$ pool of bees per group). Boxes show the 1st and 3rd interquartile range, and the line denotes the median. Whiskers encompass 90 % of the individuals; each outlier is represented by a circle. Vitellogenin expression levels significantly increased with the SHW treatment (ANOVA: $P < 0.001$).

All colonies were DWV-positive, and we observed a significant decrease in DWV loads after exposing a colony to SHW ($P = 0.003$; Figure IV-10 and Figure IV-11). Furthermore, a significant negative correlation between DWV loads and vitellogenin levels was detected before the SHW treatments ($cor = -0.42$, $P = 0.034$), but this correlation disappeared after the SHW treatments ($cor = 0.045$; $P = 0.83$).

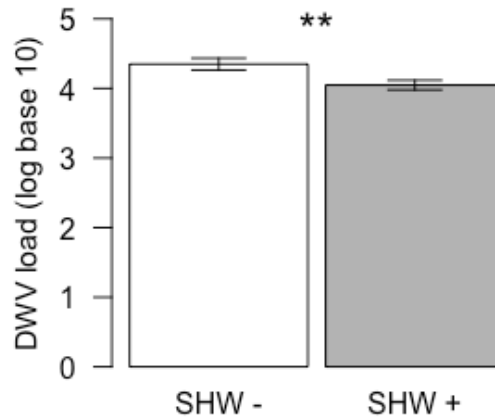


Figure IV - 10. Deformed wing virus loads according to the SHW treatments

Mean and standard error DWV load in bees sampled at the end of an SHW- (white bars) or SHW+ period (grey bars) ($n = 26$ pool for SHW-; $n = 25$ pools for SHW+). Significant differences between groups are indicated (**: $P < 0.01$, ANOVA).

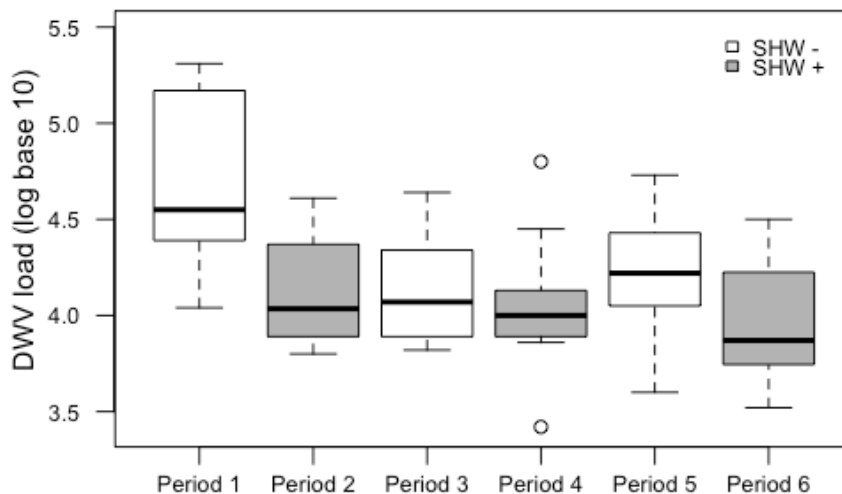


Figure IV - 11. Deformed wing virus load over the successive SHW periods.

Data are shown according to the SHW treatment in bees sampled at the end of an SHW- (white boxes) or SHW+ period (grey boxes) ($n = 8 - 9$ pool of bees per group). Boxes show the 1st and 3rd interquartile range, and the line denotes the median. Whiskers encompass 90 % of the individuals; each outlier is represented by a circle. DWV loads significantly decreased with SHW treatment (ANOVA: $P = 0.003$).

DISCUSSION

Though adult bees can tolerate a large range of temperatures, they need to control the brood rearing temperature with the utmost precision for its survival and normal growth (Himmer, 1932; Koeniger et al., 1978). The mechanism underlying the maintenance of colony thermal homeostasis has been well studied (Kleinhenz et al., 2003; Stabentheiner et al., 2010), but whether and to what extent that requires social and physiological costs has been poorly investigated. Answering those questions is essential since climate change is expected to lead to an increase in the severity and frequency of extreme weather events and might extend the list of the numerous pressures to which honeybees are exposed to (Goulson et al., 2015).

Thanks to optic bee counters and mathematical modelling, for the first time, we could quantify the daily foraging activity at the colony level; we observed a 70 % increase in forager traffic in response to a simulated heat wave. The effects were visible in the afternoon when the peak temperature was reached. Since foraging activity was based on the number of exits per bout of 5 minutes, it is reasonable to attribute the traffic increase to a higher number of foragers rather than to a higher number of trips per forager within 5 minutes. Even more, it is less likely that bees performed at least two foraging trips (including the resource distribution around the hive) within 5 minutes. As social insects, when the need of a resource increases, workers are usually recruited from a pool of previously inactive individuals (Gordon, 1989, 1987; Seeley and Kolmes, 1991). This pool can be large in honeybees since 50 % or more of adult bees can be inactive (Lindauer, 1952; Seeley and Kolmes, 1991). The bees that do not forage or rarely serve as a backup foraging force were likely to be recruited in response to a SHW.

Next, we focused on the type of resources collected by bees in response to SHW. We found that the proportion of pollen foragers was not impacted by SHW (9.5 % and 9.7 % for the SHW- and SHW+ periods, respectively), indicating that pollen flow was maintained at the colony level. This is crucial to the colony since a reduction of pollen availability would compromise the physiological development of nurses and brood rearing (Haydak, 1970; Hrasnigg and Crailsheim, 1998). However, more than double the number of water foragers (9.7 % to 19.2 %) were identified in response to SHW, confirming a previous study, which showed an increase in water foragers after exposing the brood nest to heat stress (Kühnholz and Seeley, 1997). This intensification of water collection did not occur at the expense of nectar foraging, which remained stable through the experiment but was associated with a decline in the rate of empty bees returning to the hive (from 35.9 % to 22.9 %). According to Pankiw and Page (2000), empty bees are “nectar foragers that failed to find a source of nectar with a sucrose concentration in excess of their response thresholds”. Since the same authors found that water

foragers are the workers with the lowest response threshold to sucrose, followed by pollen foragers, nectar foragers and bees returning to the colony empty (water < pollen < nectar < empty), it is likely that the SHW lowered the sucrose response threshold of bees and therefore increased the proportion of water foragers. This is further supported by the decrease in average sucrose concentration of nectar collected by foragers under SHW, although the range of sugar concentration did not change (from 0 to 75 % during SHW+ periods and from 0 to 73 % during SHW- periods, see also (Kühnholz and Seeley, 1997)). In summation, SHW would both stimulate the recruitment of foragers and lower the sucrose response threshold of bees to supply the colony with enough water and enable brood thermoregulation.

Interestingly, though on one hand, the sucrose concentration of nectar collected by bees decreased, on the other hand, its volume was higher under SHW, giving no significant change in the amount of sucrose collected per bee. In contrast, it seems that the SHW treatment increased the nectar and pollen flow of colonies since the forager traffic was almost doubled, and the rate of nectar and pollen forager was not altered. This global increase in resource flow (notably nectar) might be a response to a higher energetic demand required by colony thermoregulation (increase in water collection and brood ventilation).

The next objective was to determine whether SHW modified the level of energetic resources in individual bees. We observed that, before SHW treatment, bees sampled on brood frames had two times less glycogen than bees sampled on storage frames. The fact that nurses stored approximately 50 % less glycogen than foragers (Harrison, 1986; Neukirch, 1982) suggested that the bees sampled on brood frames had a nurse-like profile, and inversely, bees sampled on storage frames had a forager-like profile. Though the level of glycogen did not change with SHW in bees sampled on brood frames, it increased significantly in bees sampled on storage frames (+ 54 %). Since glycogen is a major source of energy for flight muscles, this change might reflect an adaption to increased activity (foraging flights, brood ventilation) and/or a higher proportion of bees with a forager-like profile on the storage frames. This last assumption is supported by the recruitment of foragers with SHW (see above). Similarly, the level of circulating sugar in haemolymph, partly originating from glycogen catabolism, was significantly higher in bees sampled on storage frames than in bees sampled on brood frames, but it did not change according to the SHW treatment. Ventilation and foraging activity being highly energy-consuming behaviours, this might indicate a quick use of haemolymph sugar by the flight muscles. Overall, the data are in line with the changes observed in the colony foraging activity, but do not reveal any cost of SHW on bee energetic resources.

In insects, the rate of biochemical reactions can be affected by environmental temperatures, and usually, a higher rate of enzymatic activity within physiological limits is observed with an increased temperature (Angilletta et al., 2010). For example, the optimal activity of the phenoloxidase enzyme is reached at temperatures above environmental temperatures (Hara et al., 1993; Lockey and Ourth, 1992), indicating that higher temperatures can enhance its performance. Consistent with this, several studies reported an improvement of immune function at higher temperatures (Adamo and Lovett, 2011; Catalán et al., 2012). Even though temperature is controlled on brood frames, there are still some variations on (colony 1: 33 to 36°C) or near the brood (colonies 2 and 3: 29 to 37°C) (Figure IV-1), and bees can move from one frame to another (storage frames exhibited the highest temperature variability). We therefore expected some changes in immunocompetence, but none of the tested immune genes exhibited changes in their expression level with SHW in bees sampled on brood frames. However, vitellogenin showed a higher expression level, which could reflect an improvement of immune (Amdam, 2011) and antioxidant capacity (Seehuus et al., 2006) or a transition to a more nurse-like profile (Amdam, 2011) to increase brood care. The fact that we observed, at the colony level, a higher proportion of foragers and no decrease in the glycogen levels of bees sampled on brood frames (as it would if bees switched to a more nurse-like profile) tends to exclude the last hypothesis. This could reveal an increased protection against oxidative stress since increased enzymatic rates in insects can lead to higher metabolic rates (Angilletta et al., 2010). In addition, this hypothesis is consistent with our previous results (Bordier et al., 2017), showing a vitellogenin increase in bees whatever their task specialization (nurse, guard and forager) in response to a heat stress in laboratory conditions.

Moreover, we found that DWV loads decreased with SHW treatment, suggesting potential effects of environmental temperatures on viral population in honeybees. Temperature variation has been shown to influence the resistance of hosts to viruses in insects (Frid and Myers, 2002; Kobayashi et al., 1981), but this DWV decline was not associated with enhanced immune functions. Indeed, the expression of immune genes did not increase, and though DWV loads were correlated to vitellogenin levels before SHW, this correlation disappeared with the SHW treatment. Our data suggest the existence of alternative physiological functions inhibiting virus multiplication or a direct thermal inhibition. In insects, a temperature dependence of host susceptibility to viral infections has been demonstrated several times. For example, in silkworm, thermal inhibition of viral diseases has been attributed to a limited accumulation of infectious progeny and the replication mechanism of the virus (Kobayashi et al., 1981). In crickets, the protective effects of high temperature are caused by the induction of heat-shock proteins in

uninfected cells (Cevallos and Sarnow, 2010). Similar mechanisms may be speculated in honeybees.

A limit of our study was that heat waves were simulated only at the colony level and not at the field level. Though high field temperature might on one hand improve forager flight performance (Szabo, 1980) owing to lower flight metabolic rate (Woods et al., 2005), on the other hand, it may lower the availability of water and flower nectar (Takkis et al., 2015). Therefore, future studies should take into account this trade-off. Nevertheless, we showed that honeybee colonies could remarkably adapt to heat waves but most importantly without being at the expense of the colony nectar and pollen flow. No cost was detected at the individual level, and SHW was rather beneficial regarding viral infection, although the impact of climate change on bee diseases should be studied long-term (Le Conte and Navajas, 2008a). The solicitation of the backup foraging or other task forces might however be costly if the colony is subjected to other environmental pressures. For example, a decrease in the availability or size of those backup forces might limit the colony capacity to buffer great field mortality. This scenario could certainly be generalized to any environmental stressors that trigger the recruitment of bees for a specific task (e.g. foragers), and not only in response to temperature increase. Finally, quantifying honeybee colony responses to climatic variations will help to model and further predict their dynamic and/or survival under different climate change scenarios (Switanek et al., 2017).

III- Conclusions

Chez certaines espèces d'abeilles, une thermorégulation passive a été décrite, au moment de la création du nid (orientation, architecture). Cependant la thermorégulation active que ce soit pour répondre à une diminution ou à une augmentation de température est nettement plus répandue. Une thermorégulation active passe par la mise en place de réponses comportementales pouvant être coûteuses en énergie. Cette étude sur l'impact des vagues de chaleur confirme que les colonies sont capables d'adopter une thermorégulation active en ajustant la collecte d'eau. Cette adaptation permet de lutter contre un danger d'hyperthermie.

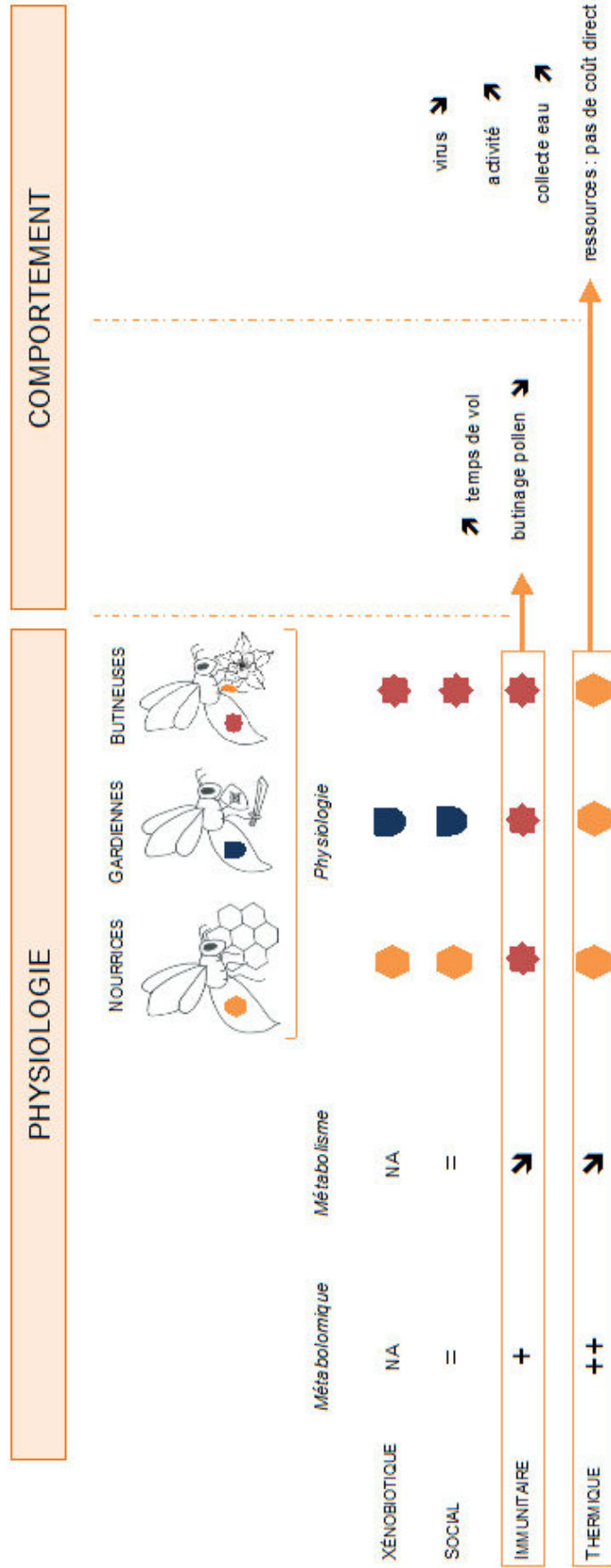
Comme conséquence de l'intensification de la collecte en eau, l'activité globale des colonies exposées aux vagues de chaleurs a augmenté. Ces résultats, suggèrent que les abeilles doivent faire face à un investissement important dans les activités à l'intérieur de la ruche, pour réguler la température du couvain, tout en maintenant la collecte des autres ressources. Pour avoir une vision plus globale du phénomène, il conviendrait de quantifier aussi l'efficacité des abeilles ayant été exposées à une vague de chaleur pendant leur développement, ce qui pourrait potentiellement avoir un impact sur les capacités cognitives.

Une des données marquantes de ce chapitre est l'induction des symptômes similaires à une fièvre par la simulation de vagues de chaleur. En effet, une diminution des charges virales en DWV, non corrélée à une augmentation de l'immunocompétence, a été montrée, ce qui semble indiquer un impact direct d'un traitement hyperthermique sur les virus.

Cette étude a confirmé l'impact que peuvent avoir des vagues de chaleurs sur *Apis mellifera* et a permis d'explorer les stratégies que les abeilles pourraient mettre en place pour y répondre. Tester la réponse d'autres sous-espèces ou écotypes, permettrait d'identifier des souches potentiellement plus résistantes aux hautes températures et ainsi les plus adaptées au changement climatique (Le Conte and Navajas, 2008b).

Résumé du Chapitre IV :

- Suite à une augmentation de la température externe :
- Augmentation de l'activité globale de butinage et de la collecte d'eau
 - Pas de coût direct au niveau de la collecte de ressource et du métabolisme énergétique individuel
 - Diminution de la charge en virus des ailes déformées (DWV)



Chapitre II

Chapitre III

Chapitre IV

CHAPITRE **V** ○ ○ ○ ○ ●

Discussion générale



I. Bilan

L'objectif principal de cette thèse était de déterminer la nature des réponses à un stress, biotique ou abiotique, chez l'abeille. Plus spécifiquement, les objectifs étaient d'identifier le caractère spécifique ou général de la réponse mise en place par les abeilles pour chaque stress et pour chaque caste comportementale. Pour cela, j'ai tout d'abord analysé les réponses physiologiques et métaboliques des abeilles à des stress de natures variées (xénobiotiques, immunitaires, thermique et social). L'étape suivante a été de déterminer si ces réponses impliquaient des changements comportementaux. Ainsi, pour avoir une vision globale de la réponse au stress, j'ai effectué une analyse qui intègre les niveaux moléculaire, métabolique et comportemental.

Cette thèse a permis de montrer clairement la capacité des abeilles à répondre à différents types de stress et ce relativement rapidement après le début du stimulus.

Chaque caste comportementale étant associée à un profil physiologique spécifique, une réponse différentielle était attendue en fonction du rôle social des abeilles. Or, ici les réponses ont été semblables entre les nourrices, gardiennes et butineuses, pour un stress donné. En revanche, la réponse était dépendante de la nature du stress (du moins en ce qui concerne leur physiologie liée à la division du travail). Seul les stress biologiquement pertinents (immunitaire et thermique) ont induit une réponse, plus ou moins importante. Cela m'a permis d'établir un gradient en fonction de l'impact de chaque stress : xénobiotique < social < immunitaire < thermique.

Les stress immunitaire et thermique qui ont induit une réponse de la part des abeilles, ont entraîné une diminution de la disponibilité en ressources énergétiques, ce qui suggère une augmentation du coût énergétique imposé par le stress et/ou une mobilisation des réserves pour pouvoir lutter contre le stress. Nous avons également vu que ces modifications au niveau énergétique pouvaient avoir des répercussions sur le comportement, notamment en ce qui concerne l'activité de butinage. Cela s'est traduit par un changement dans la préférence de ressource et une augmentation de l'activité globale de la colonie. Ainsi, le coût énergétique imposé par un stress est potentiellement à l'origine des modifications comportementales. L'augmentation des coûts énergétiques et la modification de comportement sont deux phénomènes qui risquent d'impacter l'homéostasie de la colonie. Ces deux points vont donc être plus particulièrement discutés dans la suite de ce chapitre.

II. Coût énergétique associé à une réponse au stress

Chez tous les organismes vivants, les réserves énergétiques ont un rôle prépondérant dans les processus biologiques (Hall et al., 1992; Slobodkin, 1962). Pour survivre, les organismes doivent être en mesure d'extraire suffisamment de réserves énergétiques de leur environnement et de les utiliser en fonction de leurs besoins (Brown et al., 2004), ce qui peut aboutir à des compromis entre les différentes fonctions biologiques (ex. reproduction vs immunité) (Adamo et al., 2001; Ilmonen et al., 2000; Schwenke et al., 2015). Cependant, l'optimisation de l'utilisation des substrats énergétiques permet aux organismes de mettre en place des comportements adaptés aux situations rencontrées tout en assurant leur survie.

L'exposition à un stress nécessite une mobilisation énergétique ce qui va induire une élévation du métabolisme. Chez l'abeille, l'organisation sociale ajoute un degré de complexité supplémentaire et va imposer aux individus un compromis entre les réserves énergétiques dont ils ont besoin pour leur propre survie et celles nécessaires au développement du couvain et de la colonie.

Dans les expérimentations menées lors de cette thèse, nous avons globalement observé une diminution du métabolisme et des ressources énergétiques, en réponse à un stress. Ces déficits énergétiques peuvent avoir pour conséquence de modifier le comportement ou les stratégies d'approvisionnement. En effet, il semble qu'il existe un lien assez fort entre la glycémie des abeilles et leur sensibilité au sucre (Wang et al., 2012), ce qui va influencer leur préférence de butinage (eau, nectar, pollen) (Pankiw and Page, 2000). De plus, des carences énergétiques peuvent altérer directement les performances comportementales (Kralj and Fuchs, 2010) ou indirectement leurs capacités cognitives (Jaumann et al., 2013). Des adaptations ou altérations du comportement sont donc attendues en réponse à un stress.

II.1. Sensibilité au sucre

La sensibilité au sucre, supérieure chez les butineuses de pollen que de nectar, est connue pour orienter la préférence de butinage (Pankiw and Page, 2000). Or, comme cela a déjà été démontré, l'exposition à un stress peut influencer la sensibilité au sucre (Démarets et al., 2016; Pankiw and Page, 2003), ce qui peut avoir pour conséquence directe d'altérer l'activité de butinage des abeilles, comme j'ai pu le proposer dans les articles 3 et 4. Dans l'article 3, sur l'impact d'un stress immunitaire simple sur le comportement, les abeilles ont ré-orienté leur préférence de butinage aux dépens du pollen ce qui peut être le reflet d'une modification de la sensibilité au sucre. L'hypothèse est que cela permettrait aux abeilles de butiner une ressource plus riche en sucres pour pouvoir surmonter les coûts énergétiques liés au stress immunitaire,

comme cela a déjà été observé suite à une infection parasitaire (Lach et al., 2015). À l'inverse dans l'article 4 sur l'impact de vagues de chaleur sur le comportement, une augmentation de la collecte d'eau a été observée ce qui suggère une diminution du seuil de réponse au sucre.

Puisque la variabilité individuelle dans les seuils de réponse est un mécanisme de base de la division du travail (Beshers et al., 1999; Robinson, 2002; Theraulaz et al., 1998), il est possible que le stress affecte les interactions et les performances des individus au sein de la colonie. Toutes modifications de ces seuils de réponse vont induire des changements dans la performance des tâches. En effet, les individus avec un seuil de réponse bas pour un stimulus donné vont s'impliquer plus rapidement dans la tâche associée que les autres individus, une fois que le seuil est dépassé. Les mécanismes sous-jacents à ces modifications des seuils de réponse par le stress ne sont pas clairement connus mais il est très probable qu'ils impliquent les amines biogènes. En effet, le stress peut modifier les quantités d'amines biogènes (Chen et al., 2008; Harris and Woodring, 1992) importantes dans la régulation de la sensibilité des abeilles aux stimuli et ainsi la division du travail (Schulz and Robinson, 2001; Schulz et al., 2002). Par exemple, L'OA est connue pour impacter le seuil de réponse à la gustation, en augmentant la réponse au sucre des abeilles (Scheiner et al., 2002) et va stimuler le comportement de vol (Fussnecker et al., 2006), une activité principalement attribuée aux butineuses. L'OA a également un impact sur les seuils de réponse liés à l'olfaction (Barron et al., 2002), en diminuant le seuil de réponse aux phéromones émises par le couvain. Il serait ainsi intéressant de tester si le stress peut modifier d'autres seuils de réponse que ceux au sucre.

II.2. Impact au niveau comportemental

Dans le cas où les réserves énergétiques deviennent un facteur limitant, certains organismes peuvent se soustraire de leur environnement pour aller vers un milieu plus favorable, ce qui est typiquement le cas lors d'une migration (Alerstam et al., 2003). Pour toutes les autres espèces qui ne peuvent pas migrer, comme c'est le cas pour l'abeille qui pour quitter la colonie devrait abandonner le couvain, il convient de mettre en place des réponses spécifiques. Les changements tant physiologiques que métaboliques peuvent être le reflet de modifications du comportement et inversement. Par exemple, les changements comportementaux peuvent découler directement d'un manque de ressources énergétiques. En effet, une réduction de l'activité, telle que la reproduction, le soin aux jeunes ou la recherche alimentaire, suite à une stimulation au niveau immunitaire, a déjà été observée chez les vertébrés (Aubert et al., 1997; Bonneaud et al., 2003; Owen-Ashley and Wingfield, 2006). Il a été proposé que cela puisse

correspondre à un comportement adaptatif afin de limiter la déperdition d'énergie ce qui favoriserait ainsi la survie des individus (Adelman and Martin, 2009).

Ainsi, les coûts énergétiques peuvent avoir un impact direct ou indirect sur le comportement :

- Coût direct sur le comportement par une modification de l'activité locomotrice et de butinage. Le vol chez les insectes est l'une des activités les plus coûteuses en énergie du règne animal (Dudley, 2000). De ce fait, un stress énergétique a des répercussions sur le comportement de vol et donc de butinage. Que ce soit suite à une infestation par *Nosema* (Article 2) ou suite à un stress immunitaire simple (Article 3), les capacités de vol des abeilles stressées ont été impactées, avec une augmentation du temps passé sur le terrain. Ce qui est cohérent avec les résultats de précédentes études (Alaux et al., 2014; Dhruva Naug, 2014) et qui pourrait refléter le fait que les abeilles stressées au niveau énergétique aient besoin de se reposer, même lors d'une activité de butinage, et/ou de consommer directement la ressource qu'elles ont collecté. Nous avons également pu voir que les abeilles exposées à un stress immunitaire délaissaient la collecte de pollen, probablement au profit du nectar. Ceci souligne l'importance pour l'abeille de collecter une ressource énergétiquement plus riche notamment pour pallier à une diminution des réserves énergétiques.

- Coût indirect sur le comportement par une modification des capacités cognitives des individus. Le comportement de butinage fait appel à d'importantes capacités cognitives comme l'apprentissage et la mémorisation (Giurfa, 2013; Menzel, 2012). Cependant ces fonctions sont hautement coûteuses en énergie chez l'abeille (Jaumann et al., 2013) et peuvent être impactées par la présence de pathogènes ou par un déficit nutritionnel (Arien et al., 2015; Iqbal and Mueller, 2007). Ainsi, une limitation en réserves énergétiques risque d'affecter significativement le développement des capacités cognitives et donc la navigation.

Enfin, l'exposition à un stress provoque généralement une accélération de la maturation comportementale (Downey et al., 2000; Dussaubat et al., 2013). Or, les butineuses précoces n'ont généralement pas une physiologie optimale pour le butinage et ont une probabilité de survie plus faible lors de leur premier vol (Barron, 2015). En effet, elles sont plus lourdes et ont des capacités de vol réduites par rapport à des butineuses d'âge normal (Vance et al., 2009), vraisemblablement à cause d'un métabolisme énergétique et structure des muscles pas encore adaptés au butinage (Schippers et al., 2006). Ces observations renforcent l'importance du métabolisme et/ou des réserves énergétiques dans les performances de vol et donc comportementales.

II.3. Métabolisme énergétique vs ressource énergétique

La disponibilité en ressources énergétiques, comme les sucres circulant dans l'hémolymphe et le glycogène stocké dans les tissus, a été estimée dans différentes expérimentations. De manière générale, les organismes exposés à une source de stress mobilisent leurs réserves afin d'assurer en premier lieu les fonctions indispensables à leur survie. Cette mobilisation crée un stress énergétique pour les organismes, comme cela a notamment été décrit chez des abeilles infectées par le parasite intestinal *Nosema* (Mayack and Naug, 2010).

Les sucres et le glycogène étant les principales réserves énergétiques des abeilles, en particulier pour obtenir rapidement l'énergie nécessaire au vol (Suarez et al., 2005), leur quantification suite à un stress était tout à fait justifiée. Cependant la quantification de sucres et de glycogène, ne donne qu'une image de la disponibilité en ressources énergétiques de l'organisme à un instant T. Cette mesure m'a permis de supposer une utilisation plus ou moins rapide des différents substrats. Toutefois la quantification des substrats énergétiques, ne donne pas une mesure intrinsèque du métabolisme énergétique. En effet un changement quantitatif peut refléter à la fois une modification du flux métabolique ou d'ingestion des métabolites. De manière à pouvoir conclure sur un potentiel effet des stress sur le métabolisme énergétique, il serait nécessaire de mener des expérimentations sur les changements de l'activité métabolique.

Cet aspect a été abordé dans l'article 1, où les capacités endothermiques des abeilles ont été déterminées et associées à la quantification de glycogène (pas d'effet du stress sur l'activité métabolique mais diminution de la disponibilité des réserves). Cependant cette démarche n'a pas été systématiquement suivie dans chacune de mes expérimentations.

La consommation d'oxygène (O_2) et le rejet de dioxyde de carbone (CO_2) sont des mesures permettant d'estimer l'activité métabolique. Notamment, il a été montré que la consommation de CO_2 était positivement corrélée à la température ambiante et la température corporelle chez *A. m. carnica* et *A. m. ligustica* (Kovac et al., 2014). Ainsi, il aurait pu être complémentaire d'ajouter des capteurs de CO_2 et O_2 soit dans les ruches exposées à un stress ou au niveau des groupes d'abeilles maintenus en conditions contrôlées de laboratoire, afin d'avoir une vision plus globale du stress au niveau énergétique.

III. Sensibilité au stress

Afin d'estimer au mieux la sensibilité au stress des organismes, il convient de prendre en compte aussi leurs caractéristiques génétiques, les propriétés de leur environnement, et tester leurs réponses à un gradient de stimuli.

III.1. Impact des facteurs internes

Chaque expérimentation développée dans cette thèse a été réalisée sur *Apis mellifera*, sans contrôle supplémentaire de la génétique de chaque abeille ou colonie. Or, les facteurs internes comme la génétique des individus ont une influence prépondérante sur la détermination des comportements sociaux, notamment en déterminant les seuils de réponses à divers stimuli (Robinson and Page, 1989, 1988; Robinson et al., 2008).

De ce fait les facteurs externes doivent être pris en compte pour analyser les réponses à des stimuli, comme ceux provoquant un stress. Une réponse différentielle pourrait être attendue en fonction de la génétique de chaque individu, comme cela peut être observé chez les mammifères (Novais et al., 2017). Enfin, les expériences passées ou stimuli environnementaux peuvent remodeler certaines parties du génotype à travers des mécanismes épigénétiques (Wolf and Linden, 2012). Ces mécanismes existent chez l'abeille (Herb et al. 2012), il serait donc intéressant de déterminer si une exposition à un stress peut induire des modifications épigénétiques fixant ainsi de nouveaux seuils de réponses à ce stress.

III.2. Gradient d'intensité du stress

Des réponses différentielles selon l'intensité d'un stress ont déjà été observées lors d'exposition à un pathogène tel que *Nosema* (Huang et al., 2015), ou à des pesticides (Henry et al., 2014). De ce fait, des effets plus ou moins forts au niveau physiologique, énergétique et *in fine* au niveau comportemental peuvent être suspectés en fonction de l'intensité du stimulus. Ainsi, il apparaît important de développer des expérimentations comprenant un gradient d'intensité de la source de stress afin de déterminer plus précisément la sensibilité des individus. Dans mon cas, le stress immunitaire a toujours été représenté par une piqûre unique au niveau de l'abdomen. De la même manière, lors d'un stress pathogénique, toutes les abeilles ont été infectées par le même nombre de spores et enfin lors d'une exposition à un stress thermique, celui-ci a toujours été une hyperthermie, au-dessus de la température optimale de développement du couvain. A l'image de

ce que j'ai fait pour l'exposition aux pesticides (2 doses par molécule), il aurait peut-être été judicieux de tester l'effet de gradient de stress.

Ainsi, il est possible que l'absence de différence de réponse (au niveau physiologique) entre les différentes castes comportementales soit issues de stimuli trop élevés et donc déjà au-delà du seuil de réponse de chaque caste. L'exposition à un gradient d'intensité pourrait permettre de tester de manière plus précise la sensibilité des castes comportementales au stress. En effet, chez l'abeille les seuils de réponses à des stimuli sociaux ou environnementaux évoluent avec l'âge et selon le rôle social (Collins, 1980; Robinson, 1992; Seeley, 1985) et donc il est concevable que ce soit similaire pour les réponses au stress.

IV. Perspectives

IV.1. Impact du stress sur la perception et réponse aux signaux sociaux

Pour que la colonie mette en place des réponses adaptatives aux changements environnementaux, il faut d'ores et déjà pouvoir les percevoir correctement. Cependant, chez l'abeille nous n'avons pas d'informations concernant l'impact de stress sur la perception des signaux sociaux, notamment chimiques, qui permettent de maintenir une cohésion sociale et d'adopter une réponse spécifique en fonction des besoins immédiats de la colonie. Des perturbations au niveau de la perception des signaux pourraient induire par exemple une diminution du soin au couvain si les phéromones émises par celui-ci ne sont pas correctement perçues. Cela pourrait altérer la flexibilité comportementale des individus et donc la cohésion sociale.

Il est possible que le stress affecte la perception de l'environnement au niveau des antennes, mais plus probablement le traitement des signaux au niveau du système nerveux central (cerveau). En effet, il a été montré que le stress pouvait affecter les voies de signalements comme celle des amines biogènes (Chen et al., 2008), impliquées dans la modulation des réponses aux stimuli environnementaux (Scheiner et al., 2002). La technique de l'électroantennographie permettrait de mesurer l'influence de stress sur la perception de signaux chimiques au niveau périphérique. Des analyses comportementales apporteraient des données complémentaires sur les aptitudes à intégrer et répondre à ces signaux. Cependant, il est très vraisemblable qu'une altération de la perception et de la réponse des abeilles aux signaux sociaux, n'apparaisse que lorsque le stress atteint la phase d'épuisement décrite par Selye (1950): c'est-à-dire lorsque le stress est trop intense et que certaines fonctions de l'organisme ne sont plus maintenues à un niveau normal.

IV.2. Voies de signalement de la réponse au stress

Etudier les voies de signalement au stress permettrait d'aller plus loin dans l'analyse des réponses au stress chez l'abeille, tout en identifiant des mécanismes pouvant moduler la résilience des individus.

Des similitudes ont été relevées entre les récepteurs du système opioïde des mammifères et les voies impliquant les allatotatines (AST) chez les insectes (Jekely, 2013; Kreienkamp et al., 2002; Urlacher et al., 2016). Les allatostatines sont des neuropeptides qui ont la particularité d'inhiber la synthèse d'hormone juvénile chez ces derniers (Verlinden et al., 2015).

Certains récepteurs aux allatostatines sont présents chez l'abeille (Audsley and Weaver, 2006) et il a été montré récemment que les ASTs peuvent être des médiateurs de la réponse à la phéromone d'alarme, considérée comme un stress chez l'abeille (Urlacher et al., 2017). Chez l'abeille adulte, il semblerait que les ASTs inhibent la production de JH (Jean Marc Devaud, communication personnelle), un régulateur clef des différents comportements en plus d'être impliqué dans les réponses physiologiques au stress chez les insectes (Amdam, 2011). Ainsi, afin de clarifier le rôle des ASTs dans la réponse au stress, il serait pertinent de tester la relation entre la tolérance au stress et l'expression des récepteurs à l'AST via l'injection d'ARN interférents (ARNi) ciblant ces récepteurs. L'injection d'ARNi spécifique aurait pour conséquence de diminuer le nombre de récepteurs disponibles. Ainsi si l'AST est bien un neuropeptide médiateur de la réponse au stress, nous devrions observer une augmentation de la sensibilité au stress, suite à l'injection de l'ARNi. La relation inverse pourrait être observée dans le cas d'une expérimentation utilisant des agonistes aux ASTs plutôt que des ARNi. Si le rôle des ASTs dans la régulation de la réponse au stress est avéré, il serait possible d'utiliser les voies impliquant les ASTs pour améliorer la résilience des abeilles à des pressions environnementales.

IV.3. Approfondir nos connaissances sur l'effet du stress au niveau comportemental

IV.3.1. Réversion du comportement de butinage

Sur la base des modifications physiologiques observées suite à l'exposition à un stress immunitaire ou thermique, j'ai fait l'hypothèse d'une accélération ou d'une réversion de la maturation comportementale (transition de nourrice vers butineuse), respectivement. La réversion vers des tâches de nourrices devrait, en plus des changements au niveau physiologique et métabolique, s'accompagner d'une modification du comportement au sein de la colonie. Il convient toutefois de déterminer si ces réversions ou accélérations de la maturation comportementale sont effectives. Si ces modifications comportementales sont avérées, la prochaine étape serait d'analyser leur répertoire comportemental à la fois pour les nourrices et les butineuses et préciser si les abeilles stressées développent un répertoire normal caractéristique de leur nouvelle fonction ou présente des aptitudes moindres. Lors d'une réversion ou d'une accélération du comportement, les abeilles n'ont pas nécessairement l'ensemble des caractéristiques physiologiques pour réaliser leur nouvelle tâche. Comme nous avons vu précédemment, les butineuses qui commencent une activité de butinage précocement

ont des capacités de vol moindres que des abeilles d'âge normal (Schippers et al., 2006; Vance et al., 2009). De la même manière, des butineuses qui redeviennent nourrices sont moins efficaces dans le soin au couvain que des nourrices d'un âge normal, notamment à cause de la réduction des glandes hypopharyngiennes (Robinson, 1992).

IV.3.3. Investissement dans le partage de la ressource

Au niveau comportemental, un changement dans les préférences de butinage a été observé. La collecte d'une ressource potentiellement moins coûteuse à collecter mais plus riche d'un point de vue énergétique a été privilégiée. De plus, il a été démontré que chez les butineuses parasitées par *Nosema* une diminution de la tendance à partager, avec les congénères, la ressource qu'elles ont collecté (Naug and Gibbs, 2009). L'idée serait donc de suivre par le biais d'observations comportementales, des abeilles marquées, afin d'analyser le partage des ressources au retour à la colonie. Dans le cas où ces abeilles stressées, ne partageraient pas leurs ressources, une hypothèse émerge et fait intervenir un comportement égoïste. Tout comme le montre le résultat sur la préférence de butinage, le stress énergétique imposé par le stress pourrait être trop important pour l'abeille qui de ce fait, garderait l'ensemble de ses ressources, pour compenser son déficit en réserves énergétiques. Toutefois, il est possible que les abeilles receveuses cherchent à éviter les abeilles stressées et ainsi toute source de stress. En effet, il semble qu'il soit possible de distinguer les abeilles selon leur statut physiologique. Ce qui est le cas pour les abeilles parasitées (McDonnell et al., 2013) ou intoxiquées (Fourrier et al., 2015) qui exhibent généralement un profil d'hydrocarbures cuticulaires distinct des abeilles saines ; ces profils d'hydrocarbures cuticulaires étant impliqué dans la reconnaissance sociale (Howard and Blomquist, 2005). Dans tous les cas des conséquences au niveau social peuvent être suspectées et donc méritent d'être étudiées.

V. Conclusions

Le déclin exceptionnellement rapide de la biodiversité au cours des derniers siècles indique que nous sommes entrés dans une 6^{ème} vague d'extinction massive des espèces (Ceballos et al., 2015). À la différence avec les précédentes, celle-ci est principalement liée à l'homme, notamment à l'anthropisation du paysage. Il a par exemple été montré que le taux moyen de perte d'espèces de vertébrés au siècle dernier avait été plus de 100 fois supérieur au taux attendu en l'absence d'activités humaines (Ceballos et al., 2015). Les auteurs restent néanmoins optimistes, en pensant qu'il est toujours temps d'éviter cette érosion de la biodiversité et des services écosystémiques, grâce à un effort de conservation. Seulement, pour pouvoir œuvrer au mieux en termes de conservation, il convient de bien identifier ce qui est stressant pour chaque espèce et comment elles répondent aux pressions environnementales. Dans ce contexte, j'espère que cette thèse, via son apport en connaissances sur les réponses à des stress biotiques et abiotiques des abeilles mellifères, tant au niveau individuel que social, pourra apporter sa petite pierre.

Références



© C. Bordier

A

- Abbo, P.M., Kawasaki, J.K., Hamilton, M., Cook, S.C., DeGrandi-Hoffman, G., Li, W.F., Liu, J., Chen, Y.P., 2016. Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Sci.* 00, 1–11.
- Adamo, S.A., 2012. The strings of the puppet master: how parasites change host behavior, Parasitic. ed. Oxford: Oxford University Press.
- Adamo, S.A., Lovett, M.M.E., 2011. Some like it hot: the effects of climate change on reproduction, immune function and disease resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *J. Exp. Biol.* 214, 1997–2004.
- Adamo, S.A., Jensen, M., Younger, M., 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly G-integer): trade-offs between immunity and reproduction. *Anim. Behav.* 62, 417–425.
- Adelman, J.S., Martin, L.B., 2009. Vertebrate sickness behaviors: Adaptive and integrated neuroendocrine immune responses. *Integr. Comp. Biol.* 49, 202–214.
- Alaux, C., Brunet, J.L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782.
- Alaux, C., Crauser, D., Pioz, M., Saulnier, C., Le Conte, Y., 2014. Parasitic and immune-modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *J. Exp. Biol.* 3416–3424.
- Alerstam, T., Hedenström, A., Alerstam, T., Hedenström, A., 2003. Long-distance migration: evolution and determinants. *Oikos* 103, 247–260.
- Aliferis, K.A., Copley, T., Jabaji, S., 2012. Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J. Insect Physiol.* 58, 1349–1359.
- Aliouane, Y., El Hassani, 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, 113–122.
- Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2004a. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *J. Econ. Entomol.* 97, 741–747.
- Amdam, G.V., Norberg, K., Fondrk, M.K., Page, R.E., 2004b. Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11350–5.
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1799–1802.
- Amdam, G.V., 2011. Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* 10, 18–27.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39, 767–773.
- Ament, S.A., Wang, Y., Robinson, G.E., 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: Toward a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 566–576.
- Ament, S.A., Chan, Q.W., Wheeler, M.M., Nixon, S.E., Johnson, S.P., Rodriguez-Zas, S.L., Foster, L.J., Robinson, G.E., 2011. Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *J. Exp. Biol.* 214, 3808–3821.
- Ames, A., 2000. CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res. Rev.* 34, 42–68.
- Anderson, D.L., Giacon, H., 1992. Reduced Pollen Collection by Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies Infected with *Nosema apis* and Sacbrood Virus. *J. Econ. Entomol.* 85, 47–51.
- Angilletta, Jr., M.J., Huey, R.B., Frazier, M.R., 2010. Thermodynamic effects on organismal performance: Is hotter better? *Physiol. Biochem. Zool.* 83, 197–206.
- Ardia, D.R., Gantz, J.E., Schneider, B.C., Strebel, S., 2012. Costs of immunity in insects: An induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Funct. Ecol.* 26, 732–739.

- Arien, Y., Dag, A., Zarchin, S., Masci, T., Shafir, S., 2015. Omega-3 deficiency impairs honey bee learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 201517375.
- Arnold, G., 1978. Les variations annuelles dans l'effet de groupe chez l'abeille et l'origine de la mort précoce des isolées. *Insectes Soc.* 25, 39–51.
- Arrese, E.L., Soulagés, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.
- Artaud, R. Climat passion. Sources: données ECA et NOAA, application Infoclimat <http://www.meteopassion.com/moyennes-de-juillet.ph> and <http://www.meteopassion.com/juillet.php> (2017).
- Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N., Bernardinelli, I., 2008. Virology and the honey bee. European commission.
- Audsley, N., Weaver, R.J., 2006. Analysis of peptides in the brain and corpora cardiaca-corpora allata of the honey bee, *Apis mellifera* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Peptides* 27, 512–520.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0091686

B

- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. Honey bee pathology, Academic P. ed.
- Bailey, L., Fernando, E.F.W., 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey-bees. *Ann. Appl. Biol.* 72, 27–35.
- Baker, A., Schroeder, D., 2008. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J. Invertebr. Pathol.* 98, 239–242.
- Banno, Y., Shimada, T., Kajiura, Z., Sezutsu, H., 2010. The silkworm-an attractive BioResource supplied by Japan. *Exp. Anim.* 59, 139–46.
- Barron, A.B., 2015. Death of the bee hive: understanding the failure of an insect society. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 45–50.
- Barron, A.B., Maleszka, R., Vander Meer, R.K., Robinson, G.E., 2007. Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1703–1707.
- Barron, a. B., Schulz, D.J., Robinson, G.E., 2002. Octopamine modulates responsiveness to foraging-related stimuli in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 188, 603–610.
- Bartholomew, G.A., Casey, T.M., 1978. Oxygen consumption of moths during rest, pre-flight warm-up, and flight in relation to body size and wing morphology. *J. Exp. Biol.* 76, 11–25.
- Bates, D.M., Maechle, M., Bolker, B., Walker, S., 2013. Package lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.0-5.
- Becher, M.A., Scharpenberg, H., Moritz, R.F.A., 2009. Pupal developmental temperature and behavioral specialization of honeybee workers (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 195, 673–679.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J.L., 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348–370.
- Beshers, S.N., Robinson, G.E., Mitternath, J.E., 1999. Response thresholds and division of labor in insect colonies. pp. 115–139.
- Biron, D.G., Loxdale, H.D., 2013. Host-parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *J. Exp. Biol.* 216, 148–60.
- Blacher, P., Yagound, B., Lecoutey, E., Devienne, P., Chameron, S., Châline, N., 2013. Drifting behaviour as an alternative reproductive strategy for social insect workers. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20131888.
- Blatt, J., Roces, F., 2001. Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J. Exp. Biol.* 204, 2709–2716.

- Boecking, O., Spivak, M., 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 141–158.
- Boncristiani, 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.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2003. Assessing the cost of mounting an immune response. *Am. Nat.* 161, 367–379. doi:10.1086/346134
- 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.
- Boulay, R., Quagebeur, M., Gadzinska, E.J., Lenoir, A., 1999. Social isolation in ants: evidence of its impact on survivorship and behavior in *Camponotus fellah* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology* 33, 111–124.
- Boulay, R., Soroker, V., Godzinska, E.J., Hefetz, A., Lenoir, A., 2000. Octopamine reverses the isolation-induced increase in trophallaxis in the carpenter ant *Camponotus fellah*. *J. Exp. Biol.* 203, 513–520.
- Breeze, T.D., Vaissière, B.E., Bommarco, R., Petanidou, T., Seraphides, N., Kozak, L., Scheper, J., Biesmeijer, J.C., Kleijn, D., Gyldenkaerne, 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.
- Brockmann, A., Annangudi, S.P., Richmond, T.A., Ament, S.A., Xie, F., Southey, B.R., Rodriguez-Zas, S.R., Robinson, G.E., Sweedler, J. V., 2009. Quantitative peptidomics reveal brain peptide signatures of behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2383–2388.
- Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M., West, G.B., 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771–1789.
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster* - from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 796-810.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2004. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociol. Methods Res.* 33, 261–304.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. Model Selection and Multi-Model Inference, a Practical Information-Theoretic Approach. New York, NY: Springer- Verlag.
- Butler, C.G., Free, J.B., 1952. The behaviour of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour* 4, 262–292.

C

- Cannon, W., 1935. Stresses and strains of homeostasis. *Am. J. Med. Sci.* 189, 1–14.
- Carruthers, R.I., Larkin, T.S., Firstencel, H., Feng, Z., 1992. Influence of Thermal Ecology on the Mycosis of a Rangeland Grasshopper. *Ecology* 73, 190–204.
- Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G. a., Brunet, J.L., Badiou-Beneteau, A., 2013. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2117–2124.
- Catalán, T.P., Wozniak, A., Niemeyer, H.M., Kalergis, A.M., Bozinovic, F., 2012. Interplay between thermal and immune ecology: Effect of environmental temperature on insect immune response and energetic costs after an immune challenge. *J. Insect Physiol.* 58, 310–317.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R., Barnosky, A.D., García, A., Pringle, R.M., Palmer, T.M., 2015. Accelerated modern human – induced species losses: entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 1, 1–5. doi:10.1126/JVI.01730-09
- Cevallos, R.C., Sarnow, P., 2010. Temperature protects insect cells from infection by cricket paralysis virus. *J. Virol.* 84, 1652–1657.
- Chapman, N.C., Beekman, M., Oldroyd, B.P., 2010. Worker reproductive parasitism and drift in the western honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 419–427.

- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259–284.
- 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.
- Chen, Q., Haddad, G.G., 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J. Exp. Biol.* 207, 3125–3129.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186–188.
- Chen, Y.L., Hung, Y.S., Yang, E.C., 2008. Biogenic amine levels change in the brains of stressed honeybees. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 68, 241–250.
- Choudhary, A., Sharma, D.C., 2008. Pesticide Residues in Honey Samples from Himachal Pradesh (India). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 417–422.
- Christen, V., Mittner, F., Fent, K., 2016. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Technol.* acs.est.6b00678. doi:10.1021/acs.est.6b00678
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* 267, 1244–1252.
- Clark, M.M., Galef, B.G., 1995. Prenatal influences on reproductive life history strategies. *Trends Ecol. Evol.* 10, 151–153.
- Collins, A.M., 1980. Effect of age on the response to alarm pheromone by caged honey bees. *Ann. Ent. Soc. Am.* 73, 307–309.
- Cornman, R.S., Tarpy, 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
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N. a, Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283–287.
- Crailsheim, K., Brodschneider, R., Aupinel, P., Behrens, D., Genersch, E., Vollmann, J., Riessberger-Gallé, U., 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *J. Apic. Res.* 52, 1–16.
- Cremer, S., Armitage, S. a O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social Immunity. *Curr. Biol.* 17, 693–702.

D

- De Smet, L., Hatjina, F., Ioannidis, P., Hamamtzoglou, A., Schoonvaere, K., Francis, F., Meeus, I., Smaghe, G., de Graaf, D.C., 2017. Stress indicator gene expression profiles, colony dynamics and tissue development of honey bees exposed to sub-lethal doses of imidacloprid in laboratory and field experiments. *PLoS One* 12, e0171529.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., Pham-Delègue, M.H., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 242–250.
- Démares, F.J., Crous, K.L., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., Human, H., 2016. Sucrose sensitivity of honey bees is differently affected by dietary protein and a neonicotinoid pesticide. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0156584.
- Derecka, K., Blythe, M.J., Malla, S., Genereux, D.P., Guffanti, A., Pavan, P., Moles, A., Snart, C., Ryder, T., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Schuster, E., Stöger, R., 2013. Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0068191.
- Désiré, L., Veissier, I., Després, G., Delval, E., Toporenko, G., Boissy, A., 2006. Appraisal Process in Sheep (*Ovis aries*): Interactive Effect of Suddenness and Unfamiliarity on Cardiac and Behavioral Responses. *J. Comp. Psychol.* 120, 280–287.

- 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. doi:10.1371/journal.pone.0072016.
- 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, 18466–18737.
- Dickerson, S.S., Kemeny, M.E., 2004. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol. Bull.* 130, 355–391.
- Downey, D.L., Higo, T.T., Winston, M.L., 2000. Single and dual parasitic mite infestations on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Insectes Soc.* 47, 171–176.
- Downs, S.G., Ratnieks, F., 2000. Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guarding behavior support predictions of the acceptance threshold model. *Behav. Ecol.* 11, 326–333.
- Dudley, R., 2000. *The Biomechanics of Insect Flight: Form, Function, Evolution*, Princeton, ed.
- Dukas, R., 2008. Mortality rates of honey bees in the wild. *Insectes Soc.* 55, 252–255.
- Dukas, R., 1999. Costs of memory: Ideas and predictions. *J. Theor. Biol.* 197, 41–50.
- Duong, N., Schneider, S.S., 2008. Intra-patriline variability in the performance of the vibration signal and waggle dance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Ethology* 114, 646–655.
- Duranville, C., Miniggio, C., Arnold, G., Borneck, R., 1991. Dérive des butineuses et réinfestation des colonies d'abeilles par *Varroa jacobsoni*. *La santé l'abeille* 125, 228–235.
- 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, e37017. doi:10.1371/journal.pone.0037017
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzschmar, A., Le Conte, Y., 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51.

E

- Esch, H., 1960. Über die Körpertemperaturen und den Wärmehaushalt von *Apis mellifica*. *Z. Vgl. Physiol.* 43, 305–335.
- Evans, J.D., 2006. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* 93, 135–139.
- 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.
- Evans, J.D., Schwarz, R.S., 2011. Bees brought to their knees: Microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614–620.
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72.
- Even, N., Devaud, J.-M., Barron, A., 2012. General Stress Responses in the Honey Bee. *Insects* 3, 1271–1298.

F

- Feuerbacher, E., Fewell, J.H., Roberts, S.P., Smith, E.F., Harrison, J.F., 2003. Effects of load type (pollen or nectar) and load mass on hovering metabolic rate and mechanical power output in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 206, 1855–1865.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–171.

- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Grünewald, B., Menzel, R., 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One* 9, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0091364
- Fischer, P., Grozinger, C.M., 2008. Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 95, 723–729.
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., Gerig, L., 1982. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J. Insect Physiol.* 28, 61–68.
- Forfert, N., Natsopoulou, M.E., Frey, E., Rosenkranz, P., Paxton, R.J., Moritz, R.F.A., 2015. Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission. *PLoS One* 10, e0140337. doi:10.1371/journal.pone.0140337
- Forsgren, E., Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170, 212–217.
- Fourrier, J., Deschamps, M., Droin, L., Alaux, C., Fortini, D., Beslay, D., Le Conte, Y., Devillers, J., Aupinel, P., Decourtye, A., Rueppell, O., 2015. Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0132985
- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P., 2013. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0057540
- Franzén, M., Molander, M., 2012. How threatened are alpine environments? a cross taxonomic study. *Biodivers. Conserv.* 21, 517–526.
- Free, J.B., 1958. The drifting of honey-bees. *J. Agric. Sci.* 51, 294–306.
- Freitak, D., Ots, I., Vanatoa, A., Hörak, P., Horak, P., 2003. Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proc. R. Soc. B-Biological Sci.* 270, S220–S222.
- Frich, P., Alexander, L.V., Della-Marta, P., Gleason, B., Haylock, M., Tank Klein, A.M.G., Peterson, T., 2002. Observed coherent changes in climatic extremes during the second half of the twentieth century. *Clim. Res.* 19, 193–212.
- Frid, L., Myers, J.H., 2002. Thermal ecology of western tent caterpillars *Malacosoma californicum pluviale* and infection by nucleopolyhedrovirus. *Ecol. Entomol.* 27, 665–673.
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73–S79.
- Fussnecker, B.L., Smith, B.H., Mustard, J. a., 2006. Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 52, 1083–1092.

G

- 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.
- Garrido, P.M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M.P., Zunino, P., Eguaras, M.J., 2013. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *J. Insect Physiol.* 59, 113–119.
- Gegear, R.J., Otterstatter, M.C., Thomson, J.D., 2006. Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. *Proc. Biol. Sci.* 273, 1073–1078.
- Gerig, L., 1975. The effects of juvenile hormone analogues on summer bees (*Apis mellifica* L.) in the field and laboratory. *Schweizerische Landwirtsch. Forsch.* 14, 355–370.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E., 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* 491, 105–113.
- Gillooly, J.F., Brown, J.H., West, G.B., Savage, V.M., Charnov, E.L., 2001. Effects of size and temperature on metabolic rate. *Science*. 293, 2248–2251.
- Giurfa, M., 2013. Cognition with few neurons: Higher-order learning in insects. *Trends Neurosci.* 36, 285–294.

- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. PLoS One 8. doi:10.1371/journal.pone.0058165
- Gordon, D.M., 1989. Dynamics of task switching in harvester ants. Anim. Behav. 38, 194–204.
- Gordon, D.M., 1987. Group-level dynamics in harvester ants: young colonies and the role of patrolling. Anim. Behav. 35, 833–843.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. SciencExpress 2010, 1–16. doi:10.1126/science.1255957
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). J. Insect Physiol. 58, 1042–1049.
- Greiveldinger, L., Veissier, I., Boissy, A., 2007. Emotional experience in sheep: Predictability of a sudden event lowers subsequent emotional responses. Physiol. Behav. 92, 675–683.
- Groh, C., Tautz, J., Rössler, W., 2004. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 4268–4273.
- ## H
- Hall, C.A.S., Stanford, Jack, A., Hauer, F.R., 1992. The distribution and abundance of organisms as a consequence of energy balances along multiple environmental gradients. Oikos 65, 377–390.
- Hara, T., Miyoshi, T., Tsukamoto, T., 1993. Comparative studies on larval and pupal phenoloxidase of the housefly, *Musca domestica* L. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. 106, 287–292.
- Harris, J.W., Woodring, J., 1992. Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. J. Insect Physiol. 38, 29–35.
- Harrison, J.M., 1986. Caste-Specific Changes in Honeybee Flight Capacity. Physiol. Zool. 59, 175–187.
- Harvell, C.D., 1994. The evolution of polymorphism in colonial invertebrates and social insects. Q. Rev. Biol. 69, 155–185.
- Haydak, M.H., 1970. Honey bee nutrition. Annu. Rev. Entomol. 15, 143–156.
- Heidinger, I.M.M., Meixner, M.D., Berg, S., Büchler, R., 2014. Observation of the mating behavior of honey bee (*Apis mellifera* L.) queens using radio-frequency identification (RFID): Factors influencing the duration and frequency of nuptial flights. Insects 5, 513–527.
- Hennessy, M.B., Kaiser, S., Sachser, N., 2009. Social buffering of the stress response: Diversity, mechanisms, and functions. Front. Neuroendocrinol. 30, 470–482.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, a., 2012. Response to Comment on “A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees.” Science. 337, 1453–1453.
- Herb, B.R., Wolschin, F., Hansen, K.D., Aryee, M.J., Langmead, B., Irizarry, R., Amdam, G. V., Feinberg, A.P., 2012. Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes. Nat. Neurosci. 15, 1371–1373.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J. Invertebr. Pathol. 94, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 41, 375–392.
- Himmer, A., 1932. Die Temperaturverhältnisse bei den sozialen Hymenopteren. Biol. Rev. 7, 224–253.
- Hirashima, A., Sukhanova, M.J., Rauschenbach, I.Y., 2000. Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2625–2630.

- Hou, Y., Zou, Y., Wang, F., Gong, J., Zhong, X., Xia, Q., Zhao, P., 2010. Comparative analysis of proteome maps of silkworm hemolymph during different developmental stages. *Proteome Sci.* 8, 45. doi:10.1186/1477-5956-8-45
- Howard, R.W., Blomquist, G.J., 2005. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 371–93.
- Hrassnigg, N., Crailsheim, K., 1998. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 44, 393–404.
- Huang, W.-F., Solter, L., Aronstein, K., Huang, Z., 2015. Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 124, 107–113.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39, 147–158.
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1992. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11726–11729.
- Hurlbert, S.H., 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecol. Monogr.* 54, 187–211.

I

- 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.
- Ilmonen, P., Taarna, T., Hasselquist, D., 2000. Experimentally activated immune defence in female pied flycatchers results in reduced breeding success. *Proc. Biol. Sci.* 267, 665–70.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp. Geneva, Switzerland.
- Iqbal, J., Mueller, U., 2007. Virus infection causes specific learning deficits in honeybee foragers. *Proc. Biol. Sci.* 274, 1517–1521.
- Ivanovic, J.H., 1991. Metabolic response to stressor, in: Ivanovic, Jankovic-Hlandni (Eds.), *Hormones and Metabolism in Insect Stress*. p. 27.

J

- Jaco Klok, C., Chown, S.L., 1997. Critical thermal limits, temperature tolerance and water balance of a sub-antarctic caterpillar, *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera: Tineidae). *J. Insect Physiol.* 43, 685–694.
- Jaffe, K., Blanco, M.E., 1994. Involvement of amino acids, opioids, nitric oxide, and NMDA receptors in learning and memory consolidation in crickets. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 47, 493–496.
- Janmaat, A.F., Winston, M.L., 2000. The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni* Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Soc.* 47, 177–182.
- Jaumann, S., Scudelari, R., Naug, D., 2013. Energetic cost of learning and memory can cause cognitive impairment in honeybees. *Biol. Lett.* 9, 20130149. doi:10.1098/rsbl.2013.0149
- Jay, S.C., 1965. Drifting of honeybees in commercial apiaries. I. Effect of various environmental factor. *J. Apic. Res.* 4, 167–175.
- Jekely, G., 2013. Global view of the evolution and diversity of metazoan neuropeptide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8702–8707.
- Johnson, E.C., White, M.P., 2009. Stressed-out insects: Hormonal actions and behavioral modifications. *Horm. Brain Behav.* Online 1069–1097. doi:10.1016/B978-008088783-8.00031-0

- Johnson, R.M., 2015. Honey Bee Toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Review article Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41, 312–331.
- Johnston, I.A., Bennett, A.F., 1996. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation.*, Cambridge . ed.
- Jones, J.C., 2004. Honey Bee Nest Thermoregulation: Diversity Promotes Stability. *Science*. 305, 402–404.
- Jones, J.C., Helliwell, P., Beekman, M., Maleszka, R., Oldroyd, B.P., 2005. The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 191, 1121–1129.
- Ju, R.T., Wei, H.P., Wang, F., Zhou, X.H., Li, B., 2014. Anaerobic respiration and antioxidant responses of *Corythucha ciliata* (Say) adults to heat-induced oxidative stress under laboratory and field conditions. *Cell Stress Chaperones* 19, 255–262.

K

- Kastberger, G., Winder, O., Hoetzl, T., Raspotnig, G., 1996. Behavioural features of a periodic form of massed flight activity in the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie* 27, 381–395.
- Kavaliers, M., Guglick, M.A., Hirst, M., 1987. Opioid involvement in the control of feeding in an insect, the American cockroach. *Life Sci.* 40, 665–672.
- Keeling, C.I., Slessor, K.N., 2005. A scientific note on the aliphatic esters in queen honey bees. *Apidologie* 36, 559–560.
- Kemeny, M.E., 2003. The Psychobiology of Stress. *Curr. Dir. Psychol. Sci.* 12, 124–129.
- Kingsolver, J.G., Diamond, S.E., Buckley, L.B., 2013. Heat stress and the fitness consequences of climate change for terrestrial ectotherms. *Funct. Ecol.* 27, 1415–1423.
- Kirtman, B., Power, S.B., Adedoyin, A.J., Boer, G.J., Bojariu, R., Camilloni, I., Doblas-Reyes, F., Fiore, A.M., Kimoto, M., Meehl, G., Prather, M., Sarr, A., Schär, C., Sutton, R., van Oldenborgh, G., Vecchi, G., Wang, H.-J., 2013. Near-term Climate Change: Projections and Predictability. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* [Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 953–1028.
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.-M., Barron, A.B., Lihoreau, M., 2017. Why bees are so vulnerable to environmental stressors. *Trends Ecol. Evol.* 2201, 1–11. doi:10.1016/j.tree.2016.12.009
- Kleinhenz, M., Bujok, B., Fuchs, S., Tautz, J., 2003. Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *J. Exp. Biol.* 206, 4217–4231.
- Kobayashi, M., Inagaki, S., Kawase, S., 1981. Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 38, 386–394.
- Kodrík, D., 2008. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol. Entomol.* 33, 171–180.
- Koeniger, N., Bei, D.E.R.B., Apis, D.E.R.H., 1978. Das wärmen der brut bei der honigbiene (*Apis mellifera*). *Apidologie* 9, 305–320.
- Kooijman, S.A.L.M., 2010. *Dynamic Energy Budget theory for metabolic organisation*, 3rd edition. Cambridge University Press. ISBN 9780521131119.
- Koto, A., Mersch, D., Hollis, B., Keller, L., 2015. Social isolation causes mortality by disrupting energy homeostasis in ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* doi:10.1007/s00265-014-1869-6
- Kovac, H., Käfer, H., Stabentheiner, A., Costa, C., 2014. Metabolism and upper thermal limits of *Apis mellifera carnica* and *A. m. ligustica*. *Apidologie* 664–677.
- Kovac, H., Stabentheiner, A., Hetz, S.K., Petz, M., Crailsheim, K., 2007. Respiration of resting honeybees. *J. Insect Physiol.* 53, 1250–1261.
- Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S., Tautz, J., 2007. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 193, 363–370.

- Kralj, J., Fuchs, S., 2010. *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21–28.
- Kralj, J., Fuchs, S., 2006. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie* 37, 577–587.
- Kreienkamp, H.J., Larusson, H.J., Witte, I., Roeder, T., Birgül, N., Hönck, H.H., Harder, S., Ellinghausen, G., Buck, F., Richter, D., 2002. Functional annotation of two orphan G-protein-coupled receptors, drostar1 and -2, from *Drosophila melanogaster* and their ligands by reverse pharmacology. *J. Biol. Chem.* 277, 39937–39943.
- Kronenberg, F., Heller, H.C., 1982. Colonial Thermoregulation in Honey Bees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. B* 148, 65–76.
- Kühnholz, S., Seeley, T.D., 1997. The control of water collection in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 41, 407–422.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B., Bojesen Christensen, R.H., 2013. Package “lmerTest”. Tests for Random and Fixed Effects for Linear Mixed Effect Models (lmer Objects of lme4 Package). R package version 2.0-3.

L

- Lach, L., Kratz, M., Baer, B., 2015. Parasitized honey bees are less likely to forage and carry less pollen. *J. Invertebr. Pathol.* 130, 64–71. d
- Ladas, A., 1972. The influence of some internal and external factors upon the insecticide resistance of honeybee. *Apidologie* 3, 55–78.
- Laughlin, S.B., Van Steveninck, R.R.R., Anderson, J.C., 1998. The metabolic cost of neural information. *Nat. Neurosci* 1, 36–41.
- Lazzaro, B.P., Flores, H. a., Lorigan, J.G., Yourth, C.P., 2008. Genotype-by-environment interactions and adaptation to local temperature affect immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 4, 1–9. doi:10.1371/journal.ppat.1000025
- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., 1990. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften* 77, 334–336.
- Le Conte, Y., Navajas, M., 2008a. Climate change : impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech. Int. Des Epizoot.* 27, 485–497.
- Le Conte, Y., Navajas, M., 2008b. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech.* 27, 485–497, 499–510.
- Lenth, R. V., 2016. Least-Squares Means: The {R} Package {lsmeans}. *J. Stat. Softw.* 69, 1–33. doi:10.18637/jss.v069.i01
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A.L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J.-M., Crauser, D., Slessor, K.N., Robinson, G.E., 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17559–17564.
- Lindauer, M., 1954. Temperaturregulierung und Wasserhaushalt im Bienenstaat. *Zeitschrift für vergleichende Physiol. Angew. Entomol.* 36, 108–112.
- Lindauer, M., 1952. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. Vgl. Physiol.* 34, 299–345.
- Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Everett, J.R., 2000. Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn. Reson.* 12, 289–320.
- 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.
- Lockey, T.D., Ourth, D.D., 1992. Isolation and Characterization of Hemolymph Phenoloxidase From *Heliothis-Virescens* Larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochemistry Mol. Biol.* 102, 891–896.
- Lopez-Martinez, G., Elnitsky, M.A., Benoit, J.B., Lee, R.E., Denlinger, D.L., 2008. High resistance to oxidative damage in the Antarctic midge *Belgica antarctica*, and developmentally linked

- expression of genes encoding superoxide dismutase, catalase and heat shock proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 796–804.
- Lopez-Vaamonde, C., Koning, J.W., Brown, R.M., Jordan, W.C., Bourke, A.F.G., 2004. Social parasitism by male-producing reproductive workers in a eusocial insect. *Nature* 430, 557–560.
- Lorenz, M.W., Kellner, R., Woodring, J., Hoffmann, K.H., Gäde, G., 1999. Hypertrehalosaemic peptides in the honeybee (*Apis mellifera*): Purification, identification and function. *J. Insect Physiol.* 45, 647–653.
- M**
- MacKenzie, K.E., Winston, M.L., 1989a. Effects of Sublethal Exposure to Diazinon on Longevity and Temporal Division of Labor in the Honey Bee (Hymenoptera, Apidae). *J. Econ. Entomol.* 82, 75–82.
- MacKenzie, K.E., Winston, M.L., 1989b. The effects of sublethal exposure to diazinon, carbaryl and resmethrin on longevity and foraging in *Apis mellifera* L. *Apidology* 20, 29–40.
- Mackert, A., do Nascimento, A.M., Bitondi, M.M.G., Hartfelder, K., Simões, Z.L.P., 2008. Identification of a juvenile hormone esterase-like gene in the honey bee, *Apis mellifera* L.--expression analysis and functional assays. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 150, 33–44.
- Malmendal, A., Johannes, O., Bundy, J.G., Sorensen, J.G., Nielsen, N.C., Loeschcke, V., Holmstrup, M., 2006. Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila*. *Am. J. Physiol.* 291, 205–212..
- Mandl, M., Stabentheiner, A., Kovac, H., 2004. Cooling by water droplets in a breeding honeybee colony. In: *Proceedings of the First European Conference of Apidology EurBee* (Bernardinelle, I & Milani, N, Eds.), Arti Grafiche Friulane SpA, Udine. p. 59 p.
- Martinet, B., Lecocq, T., Smet, J., Rasmont, P., 2015. A Protocol to Assess Insect Resistance to Heat Waves, Applied to Bumblebees (*Bombus Latreille*, 1802). *PLoS One* 10, e0118591. doi:10.1371/journal.pone.0118591
- Mayack, C., Natsopoulou, M.E., McMahan, D.P., 2015. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Mol. Biol.* 24, 662–670.
- Mayack, C., Naug, D., 2010. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* 56, 1572–1575.
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.
- 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, 25.
- Meana, A.M., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 49, 212–214.
- Michener, C.D., 1969. Comparative Social Behavior of Bees. *Annu. Rev. Entomol.* 14, 299–342.
- Moore, A.J., Breed, M.D., Moor, M.J., 1987. The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Anim. Behav.* 35, 1159–1167.
- Moore, M.C., 1991. Application of organization-activation theory to alternative male reproductive strategies: A review. *Horm. Behav.* 25, 154–179.
- Mullin, C. a., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0009754
- Münch, D., Amdam, G. V., Wolschin, F., 2008. Ageing in a eusocial insect: Molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Funct. Ecol.* 22, 407–421.
- Murdock, C.C., Paaijmans, K.P., Bell, A.S., King, J.G., Hillyer, J.F., Read, A.F., Thomas, M.B., 2012. Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proc. Biol. Sci.* 279, 3357–3366.

N

- Nanork, P., Chapman, N.C., Wongsiri, S., Lim, J., Gloag, R.S., Oldroyd, B.P., 2007. Social parasitism by workers in queenless and queenright *Apis cerana* colonies. *Mol. Ecol.* 16, 1107–1114.
- Nanork, P., Paar, J., Chapman, N.C., Wongsiri, S., Oldroyd, B.P., 2005. Entomology: Asian honeybees parasitize the future dead. *Nature* 437, 829.
- Naug, D., 2014. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biol. Lett.* 10, 20140731. doi: 10.1098/rsbl.2014.0731.
- Naug, D., Gibbs, A., 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40, 595–599.
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G. V., 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5, 0673–0677.
- Neukirch, A., 1982. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *J. Comp. Physiol.* 146, 35–40.
- Neumann, P., Moritz, R.F.A., Mautz, D., 2000. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (*Apis mellifera* L.) at a performance testing apiary. *Apidologie* 31, 67–79.
- Neumann, P., Radloff, S.E., Pirk, C.W.W., Hepburn, R., 2003. The behaviour of drifted Cape honeybee workers (*Apis mellifera capensis*): predisposition for social parasitism? *Apidologie* 34, 585–590.
- Newman, Y., Ring, S., Colaco, C., 1993. The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 11, 263–294.
- Nicholas, L., Calderone, W., 1998. Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 29, 127–158.
- Nijhout, H.F., 1994. *Insect Hormones*, Princeton Univ. Press ed.
- Nogueira-Couto, R.H., Abe, C.S., Pitelli, R.A., 1996. Effect of paraquat in *Apis mellifera* Africanized bees mortalit. *Nat. Sao Paulo* 21, 49–55.
- Novais, A., Monteiro, S., Roque, S., Correia-Neves, M., Sousa, N., 2017. How age, sex and genotype shape the stress response. *Neurobiol. Stress* 6, 44–56.
- Núñez, J., Almeida, L., Balderrama, N., Giurfa, M., 1998. Alarm pheromone induces stress analgesia via an opioid system in the honeybee. *Physiol. Behav.* 63, 75–80.
- Núñez, J., Maldonado, H., Miralto, A., Balderrama, N., 1983. The stinging response of the honeybee: effects of morphine, naloxone and some opioid peptides. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19, 921–924.
- Nyamukondiwa, C., Weldon, C.W., Chown, S.L., le Roux, P.C., Terblanche, J.S., 2013. Thermal biology, population fluctuations and implications of temperature extremes for the management of two globally significant insect pests. *J. Insect Physiol.* 59, 1199–1211.

O

- O'Connor, S., Park, K.J., Goulson, D., 2013. Worker drift and egg dumping by queens in wild *Bombus terrestris* colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67, 621–627.
- Oldroyd, B.P., Wongsiri, S., 2006. *Asian Honey Bees. Biology, Conservation and Human Interactions*, Harvard Un. ed.
- Olsen, L.E., Hoy, M. a., 2002. Heat curing *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari, Phytoseiidae) of a fitness-reducing microsporidium. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 173–178.
- Owen-Ashley, N.T., Wingfield, J.C., 2006. Seasonal modulation of sickness behavior in free-living northwestern song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J. Exp. Biol.* 209, 3062–3070.

P

- Paar, J., Oldroyd, B.P., Huettinger, E., Kastberger, G., 2002. Drifting of workers in nest aggregations of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie* 33, 553–561.
- Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Reponse: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Rev.* 22, 502–548.

- Palmer, M.J., Moffat, C., Saranzewa, N., Harvey, J., Wright, G. a, Connolly, C.N., 2013. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. *Nat. Commun.* 4, 1634. doi:10.1038/ncomms2648
- Pankiw, T., Page Jr, R.E., 2000. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 47, 265–267.
- Pankiw, T., Page Jr, R.E., 1999. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 185, 207–213.
- Pankiw, T., Page, R.E., 2003. Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 189, 675–684.
- Panzenböck, U., Crailsheim, K., 1997. Glycogen in honeybee queens, workers and drones (*Apis mellifera carnica* Pollm.). *J. Insect Physiol.* 43, 155–165.
- Parmesan, C., 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Ecol. Evol. Syst.* 37, 637–669.
- Parrou, J.L., François, J., 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* 248, 186–188.
- Perry, C.J., Søvik, E., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2015. Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colonies. *PNAS.* 112, 3427–32.
- Pfeiffer, K.J., Crailsheim, K., 1998. Drifting of honeybees. *Insectes Soc.* 45, 151–167.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353.

R

- R Development Core Team., 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Development Core Team., 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rachinsky, A., Hartfelder, K., 1990. Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *J. Insect Physiol.* 36, 189–194.
- Reetz, J.E., Zühlke, S., Spittler, M., Wallner, K., 2012. A method for identifying water foraging bees by refractometer analysis: a spotlight on daily and seasonal water collecting activities of *Apis mellifera* L. *J. für Verbraucherschutz und Leb.* 7, 283–290.
- Richard, F.-J., Aubert, A., Grozinger, C.M., 2008. Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biol.* 6. doi:10.1186/1741-7007-6-50
- Richard, F.-J., Holt, H.L., Grozinger, C.M., 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 13. doi:10.1186/1471-2164-13-558
- Robinson, G.E., 2002. Genomics and integrative analyses of division of labor in honeybee colonies. *Am. Nat.* 160, S160–S172. doi:10.1086/342901
- Robinson, G.E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 637–665.
- Robinson, G.E., 1987. Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20, 329–338.
- Robinson, G.E., 1987. Modulation of Alarm Pheromone Perception In the Honey-bee - Evidence For Division-of-labor Based On Hormonally Regulated Response Thresholds. *J Comp Physiol A* 160, 613–619.
- Robinson, G.E., Fernald, R.D., Clayton, D.F., 2008. Genes and social behavior. *Science* 322, 896–900. doi:10.1126/science.1159277
- Robinson, G.E., Huang, Z.-Y., 1998. Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie* 29, 159–170.

- Robinson, G.E., Page, R.E., 1989. Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 24, 317–323.
- Robinson, G.E., Page, R.E., 1988. Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333, 356–358.
- Roff, D.A., 1986. The Evolution of Wing Dimorphism in Insects. *Evolution* (N. Y.) 40, 1009–1020.
- Rothe, U., Nachtigall, W., 1989. Flight of the honey bee - IV. Respiratory quotients and metabolic rates during sitting, walking and flying. *J. Comp. Physiol. B* 158, 739–749.
- Roubik, D.W., Buchmann, S.L., 1984. Nectar Selection by *Melipona* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and the Ecology of Nectar Intake by Bee Colonies in a Tropical Forest. *Oecologia* 61, 1–10.
- Rusch, A., Suchail, S., Valantin-Morison, M., Sarthou, J.P., Roger-Estrade, J., 2013. Nutritional state of the pollen beetle parasitoid *Tersilochus heterocerus* foraging in the field. *BioControl* 58, 17–26.

S

- Salmela, H., Stark, T., Stucki, D., Fuchs, S., Freitag, D., Dey, A., Kent, C.F., Zayed, A., Dhaygude, K., Hokkanen, H., Sundström, L., 2016. Ancient Duplications Have Led to Functional Divergence of Vitellogenin-Like Genes Potentially Involved in Inflammation and Oxidative Stress in Honey Bees. *Genome Biol. Evol.* 8, 495–506.
- Scheiner, R., Barnert, M., Erber, J., 2003. Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bee. *Apidologie* 34, 67–72.
- Scheiner, R., Page, R., Erber, J., 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 35, 133–142.
- Scheiner, R., Plückhahn, S., Öney, B., Blenau, W., Erber, J., 2002. Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav. Brain Res.* 136, 545–553.
- Scheiner, R., Toteva, A., Reim, T., Søvik, E., Barron, A.B., 2014. Differences in the phototaxis of pollen and nectar foraging honey bees are related to their octopamine brain titers. *Front. Physiol.* 5, 1–8. doi:10.3389/fphys.2014.00116
- Schippers, M.-P., Dukas, R., Smith, R.W., Wang, J., Smolen, K., McClelland, G.B., 2006. Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *J. Exp. Biol.* 209, 3828–3836.
- Schmehl, D.R., Teal, P.E. a, Frazier, J.L., Grozinger, C.M., 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 71, 177–190.
- Schmid-Hempel, R., Schmid-Hempel, P., 1998. Colony performance and immunocompetence of a social insect, *Bombus terrestris*, in poor and variable environments. *Funct. Ecol.* 12, 22–30.
- Schulz, D.J., Barron, A.B., Robinson, G.E., 2002. A role for octopamine in honey bee division of labor. *Brain. Behav. Evol.* 60, 350–359.
- Schulz, D.J., Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42, 295–303.
- Schulz, D.J., Robinson, G.E., 2001. Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J. Comp. Physiol. - A Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 187, 53–61.
- Schwenke, R.A., Lazzaro, B.P., Wolfner, M.F., 2015. Reproduction – Immunity Trade-Offs in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 239–256.
- 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.
- Seeley, T., 1995. *The Wisdom of the Hive*, Harvard University Press.
- Seeley, T.D., 1985. *Honeybee Ecology, A Study of Adaptation in Social Life*, Princeton. ed.
- Seeley, T.D., 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11, 287–293.

- Seeley, T.D., Kolmes, S.A., 1991. Age Polyethism For Hive Duties In Honey-bees - Illusion Or Reality. *Ethology* 87, 284–297.
- Selye, H., 1950. Stress and the General Adaptation Syndrome. *Br. Med. J.* 2, 215.
- 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.
- Silver, R., 1993. Environmental factors influencing hormone secretion, in: Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. (Eds.), *Behavioral Endocrinology*. pp. 401–422.
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M., 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution (N. Y.)* 63, 3016–3022.
- Sitbon, G., 1967. L'effet de groupe et la mortalité des abeilles d'hiver et d'été, isolées et groupées. *Ann. l'abeille* 10, 203–212.
- Slessor, K.N., Winston, M.L., Le Conte, Y., 2005. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.* 31, 2731–2745.
- Slobodkin, L.B., 1962. Energy in animal ecology. *Adv. Ecol.* 1, 69–101.
- Smith, S.M., Vale, W.W., 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 383–395.
doi:10.1038/nrendo.2011.222
- Smriga, M., Torii, K., 2003a. Prolonged treatment with L-lysine and L-arginine reduces stress-induced anxiety in an elevated plus maze. *Nutr Neurosci* 6, 125–128.
- Smriga, M., Torii, K., 2003b. L-Lysine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15370–5. doi:10.1073/pnas.2436556100
- Southwick, E.E., Buchmann, S.L., 1995. Effects of Horizon Landmarks on Homing Success in Honey Bees. *Am. Nat.* 146, 748. doi:10.1086/285823
- Southwick, E.E., Moritz, R.F.A., 1987. Social control of air ventilation in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 33, 623–626.
- Søvik, E., Cornish, J.L., Barron, A.B., 2013. Cocaine Tolerance in Honey Bees. *PLoS One* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0064920
- Søvik, E., Perry, C.J., Lamora, A., Barron, A.B., Ben-Shahar, Y., Søvik, E., Perry, C.J., Lamora, A., Barron, A.B., Ben-Shahar, Y., 2015. Negative impact of manganese on honeybee foraging. *Biol. Lett.* 11, 20140989–20140989. doi:10.1098/rsbl.2014.0989
- Speth, M.T., Kreibich, C.D., Amdam, G. V., Münch, D., 2015. Aging- and task-related resilience decline is linked to food responsiveness in highly social honey bees. *Exp. Gerontol.* 65, 46–52.
- Spivak, M., Reuter, G.S., 2001. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *J. Econ. Entomol.* 94, 326–331.
- Stabentheiner, A., Kovac, H., Brodschneider, R., 2010. Honeybee colony thermoregulation - Regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0008967
- Stabentheiner, A., Vollmann, J., Kovac, H., Crailsheim, K., 2003. Oxygen consumption and body temperature of active and resting honeybees. *J. Insect Physiol.* 49, 881–889.
- Stacey, D.A., Thomas, M.B., Blanford, S., Pell, J.K., Pugh, C., Fellowes, M.D.E., 2003. Genotype and temperature influence pea aphid resistance to a fungal entomopathogen. *Physiol. Entomol.* 28, 75–81.
- Stratakis, C.A., Chrousos, G.P., 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 771, 1–18.
- Straub, L., Williams, G.R., Pettis, J., Fries, I., Neumann, P., 2015. Superorganism resilience: Eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Curr. Opin. Insect Sci.* 12, 109–112.
- Suarez, R.K., Darveau, C.A., Welch Jr., K.C., O'Brien, D.M., Roubik, D.W., Hochachka, P.W., 2005. Energy metabolism in orchid bee flight muscle: carbohydrate fuels all. *J. Exp. Biol.* 208, 3573–3579.

- Sukhanova, M.J., Shumnaya, L. V., Grenback, L.G., Gruntenko, N.E., Khlebodarova, T.M., Rauschenbach, I.Y., 1997. Tyrosine Decarboxylase and dopa decarboxylase in *Drosophila virilis* under normal conditions and heat stress: Genetic and physiological aspects. *Biochem. Genet.* 35, 91–104.
- Sullivan, J.P., Jassim, O., Fahrback, S.E., Robinson, G.E., 2000. Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Horm. Behav.* 37, 1–14.
- Sumner, S., Lucas, E., Barker, J., Isaac, N., 2007. Radio-Tagging Technology Reveals Extreme Nest-Drifting Behavior in a Eusocial Insect. *Curr. Biol.* 17, 140–145.
- Sved, A.F., Cano, G., Passerin, A.M., Rabin, B.S., 2002. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. *Physiol. Behav.* 77, 737–742.
- Switanek, M., Crailsheim, K., Truhetz, H., Brodschneider, R., 2016. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. *Sci. Total Environ.* 579, 1581–1587.
- Szabo, T.I., 1980. Effect of weather factors on honeybee flight activity and colony weight gain. *J. Apic. Res.* 19, 164–171.

T

- Tahori, A.S., Sobel, Z., Soller, M., 1969. Variability in insecticide tolerance of eighteen honey-bee colonies. *Entomol. Exp. Appl.* 12, 85–98.
- Takahashi, J.I., Martin, S.J., Ono, M., Shimizu, I., 2010. Male production by non-natal workers in the bumblebee, *Bombus deuteronymus* (Hymenoptera: Apidae). *J. Ethol.* 28, 61–66.
- Takkis, K., Tscheulin, T., Tsalkatis, P., 2015. Climate change reduces nectar secretion in two common Mediterranean plants. *Ann. Bot.* 1–38.
- Tautz, J., Maier, S., Groh, C., Rossler, W., Brockmann, A., 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7343–7347.
- Therneau, T.M., Lumley, T., 2014. Package “survival”. *Survival Analysis. R package version 2.37-7.*
- Tókécs, T., Tuboly, E., Varga, G., Major, L., Ghyczy, M., Kaszaki, J., Boros, M., 2014. Protective effects of L-alpha-glycerolphosphorylcholine on ischaemia-reperfusion-induced inflammatory reactions. *Eur. J. Nutr.* 54, 109–118.
- Toth, A.L., Kantarovich, S., Meisel, A.F., Robinson, G.E., 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *J. Exp. Biol.* 208, 4641–4649.
- Toth, A.L., Robinson, G.E., 2005. Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim. Behav.* 69, 427–435.

U

- Urlacher, E., Devaud, J.-M., Mercer, A.R., 2017. C-type allatostatins mimic stress-related effects of alarm pheromone on honey bee learning and memory recall. *PLoS One* 12, e0174321. doi:10.1371/journal.pone.0174321
- Urlacher, E., Soustelle, L., Parmentier, M.L., Verlinden, H., Gherardi, M.J., Fourmy, D., Mercer, A.R., Devaud, J.M., Massou, I., 2016. Honey bee allatostatins target galanin/somatostatin-like receptors and modulate learning: A conserved function? *PLoS One* 11, 1–30. doi:10.1371/journal.pone.0146248

V

- 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.
- 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.

- Vandame, R., Meled, M., Colin, M.-E., Belzunces, L.P., 1995. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 855–860.
- Veenstra, J.A., Rodriguez, L., Weaver, R.J., 2012. Allatotropin, leucokinin and AKH in honey bees and other Hymenoptera. *Peptides* 35, 122–130.
- Verlinden, H., Gijbels, M., Lismont, E., Lenaerts, C., Vanden Broeck, J., Marchal, E., 2015. The pleiotropic allatoregulatory neuropeptides and their receptors: A mini-review. *J. Insect Physiol.* 80, 2–14.

W

- Wada-Katsumata, A., Yamaoka, R., Aonuma, H., 2011. Social interactions influence dopamine and octopamine homeostasis in the brain of the ant *Formica japonica*. *J. Exp. Biol.* 214, 1707–13.
- Waddington, K.D., Rothenbuhler, W.C., 1976. Behaviour associated with hairless-black syndrome of adult honeybees. *J. Apic. Res.* 15, 35–41.
- Wang, D.I., Mofler, F., 1970. The Division of Labor and Queen Attendance Behavior of *Nosema*-Infected Worker Honey Bees1, 2. *J. Econ. Entomol.* 63, 1539–1541.
- Wang, Y., Brent, C.S., Fennern, E., Amdam, G. V., 2012. Gustatory perception and fat body energy metabolism are jointly affected by vitellogenin and juvenile hormone in honey bees. *PLoS Genet.* 8. doi:10.1371/journal.pgen.1002779
- Williams, J.W., Jackson, S.T., 2007. Novel climates, no-analog communities , and ecological surprises. *Front. Ecol. Environ.* 5, 475–482.
- Williams, J.W., Jackson, S.T., Kutzbach, J.E., 2007. Projected distributions of novel and disappearing climates by 2100 AD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5738–5742.
- Wilson, E.O., 1971. *The insect societies*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- 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.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T., 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 405–423.
- Winston, M.L., 1987. *The biology of the honey bee*, Harvard Un. ed.
- Wise, R.A. 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 483–494.
- Wolf, C., Linden, D.E.J., 2012. Biological pathways to adaptability - interactions between genome, epigenome, nervous system and environment for adaptive behavior. *Genes, Brain Behav.* 11, 3–28.
- Wolf, S., McMahon, D.P., Lim, K.S., Pull, C.D., Clark, S.J., Paxton, R.J., Osborne, J.L., 2014. So near and yet so far: Harmonic radar reveals reduced homing ability of nosema infected honeybees. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0103989
- Woodring, J., Hoffmann, K.H., Lorenz, M.W., 2003. Identification and function of the hypotrehalosaemic hormone (Mas-AKH) in workers, drones and queens of *Apis mellifera ligustica* and *A. m. carnica*. *J. Apic. Res.* 42, 4–8.
- Woods, W., Heinrich, B., Stevenson, R., 2005. Honeybee flight metabolic rate: does it depend upon air temperature? *J. Exp. Biol.* 208, 1161–1173.
- Woyke, J., Wilde, J., Wilde, M., 2003. Flight activity reaction to temperature changes in *Apis dorsata*, *Apis laboriosa* and *Apis mellifera*. *J. Apic. Sci.* 47, 73–80.

Z

- Zabala, N.A., Miralto, A., Maldonado, H., Nuñez, J.A., Jaffe, K., Calderon, L.D., 1984. Opiate receptor in praying mantis: effect of morphine and naloxone. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20, 683–687.
- Zanette, L.R.S., Miller, S.D.L., Faria, C.M. a, Lopez-Vaamonde, C., Bourke, A.F.G., 2014. Bumble bee workers drift to conspecific nests at field scales. *Ecol. Entomol.* 39, 347–354.

Le stress chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*) : analyse des modifications physiologiques et comportementales

RESUME : L'abeille domestique (*Apis mellifera*) a un rôle majeur dans les écosystèmes naturels et agronomiques mais est exposée à un nombre croissant de pressions environnementales (nouveaux parasites, xénobiotiques, variations climatiques et malnutrition). Dans ce contexte, la compréhension des phénomènes impliqués dans les réponses au stress ainsi que leurs coûts associés devient cruciale pour mieux appréhender l'impact de ces pressions sur les abeilles.

L'émergence d'un stress perturbe généralement l'homéostasie de l'organisme qui doit mettre en place une cascade d'adaptations physiologiques et comportementales pour le surmonter. Cependant, du fait de son mode de vie social, il est raisonnable de penser que les réponses vont se faire dans l'intérêt du groupe et non plus seulement dans l'intérêt de l'individu. Afin de caractériser les réponses au stress et de déterminer leur spécificité en fonction de la nature du stimulus (xénobiotiques, immunitaire, thermique, social), j'ai adopté une approche multidisciplinaire en ciblant l'identification des modifications *i)* physiologiques associées à la division du travail, *ii)* du métabolisme énergétique, et *iii)* comportementales.

J'ai démontré que quel que soit leur rôle social (nourrice, gardienne, butineuse), les abeilles répondent de la même manière à un stress donné, si celui-ci est écologiquement pertinent (hyperthermie et stress immunitaire mais pas xénobiotique). Une tendance à la diminution des ressources énergétiques a également été observée suite à un stress suggérant une modification des performances comportementales. Afin de vérifier cela, je me suis concentrée sur l'activité de butinage ; le vol chez les insectes étant un des processus physiologiques les plus coûteux du règne animal. Une altération des performances de butinage a été mise en évidence chez les abeilles soumises à un stress immunitaire avec une réorientation des préférences de butinage au dépend du pollen, plus coûteux à collecter et moins riche en ressource énergétique que le nectar ; ceci probablement pour pallier au coût énergétique du stress. En revanche, en réponse à une hyperthermie, une augmentation de l'activité de butinage a été observée mais sans engendrer un coût supplémentaire au niveau des ressources collectées.

Ces résultats sont discutés à la lumière du coût énergétique du stress et des conséquences potentielles sur les performances des abeilles, qui *in fine* pourrait perturber l'homéostasie énergétique de la colonie.

MOTS CLEFS : *Apis mellifera*, stress immunitaire, hyperthermie, pesticides, stress social, vitellogénine, métabolisme énergétique, division du travail, comportement de butinage

Stress in honeybees (*Apis mellifera*): physiological and behavioural modifications

ABSTRACT: Honeybees (*Apis mellifera*), which play an important role in natural and agronomic ecosystems, are exposed to a growing number of environmental pressures (new parasites, pesticides, climate change and poor nutrition). In this context, deciphering the mechanisms underlying stress responses and their costs becomes crucial to better understand the impact of these pressures.

Stress usually represents a challenge to the homeostasis of an organism. In response, a cascade of physiological and behavioural adaptations enables the organism to cope with the stress. However, due to their social life style, we could suggest that stress response in honeybees will occur in the interest of the colony and not only in the interest of the individual. To characterise the stress response and determine its specificity according to the stimulus (xenobiotic, immune, thermal, social), I developed a multidisciplinary approach to identify changes in *i*) task-related physiology, *ii*) energetic metabolism, and *iii*) behaviour.

I demonstrated that, regardless of their social function (nurse, guard, forager), bees respond in the same way to a given stress, if it is ecologically-relevant (heat and immune stress but not pesticides). A tendency toward decreasing energetic resources was also observed following stress exposure, which suggests changes in behavioural performance. In order to test this hypothesis, I analysed changes in foraging activity in response to stress, as insect flight is one of the most costly physiological processes in the animal kingdom. I found that foraging performances were affected by an immune stress: bees changed their foraging preferences at the expense of pollen, probably to reduce the stress energetic cost, given that pollen is more costly to collect and provides a lower energetic return than nectar. In contrast, in response to heat stress, an increase in colony foraging activity was observed, without an additional cost on resource collection.

These results are discussed in the light of stress energetic cost and its potential consequences on honeybee performances, which could disrupt the colony's energetic homeostasis.

KEYWORDS : *Apis mellifera*, immune stress, heat stress, pesticides, social stress, vitellogenin, energetic metabolism, division of labour, foraging behaviour