

# Impacts et interactions de la microsporidie Nosema cerenae et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique, Apis mellifera

Régis Rouzé

## ► To cite this version:

Régis Rouzé. Impacts et interactions de la microsporidie Nosema cerenae et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique, Apis mellifera. Biologie animale. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT: 2020CLFAC076. tel-03369414

# HAL Id: tel-03369414 https://theses.hal.science/tel-03369414

Submitted on 7 Oct 2021

**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.

# UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE

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

## Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Microbiologie

Soutenue le 4 septembre 2020 par

# **Régis ROUZÉ**

# Impacts et interactions de la microsporidie Nosema ceranae et d'insecticides neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique Apis mellifera

## Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Angélique VÉTILLARD, MCU, HDR INU Champollion, Albi	
	M. Philippe BULET, DR CNRS Institut pour l'Avancée des Biosciences, La Tronche	
Examinateurs :	Mme Catherine ARMENGAUD, MCU, HDR Université Paul Sabatier, Toulouse	
	Mme Mahchid BAMDAD, PU Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand	
<i>Directeurs de thèse :</i>	M. Nicolas BLOT, MCU, HDR <i>Université Clermont Auvergne</i> , Clermont-Ferrand	
	M. Luc BELZUNCES, DR INRAE UR Abeille et Environnement, Avignon	

# <u>Résumé</u>

L'abeille domestique, Apis mellifera, est un pollinisateur qui joue un rôle économique et écologique majeur. Les pertes de colonies d'abeilles observées depuis quelques décennies seraient le reflet d'un déclin plus global des pollinisateurs. Ce déclin aurait une origine multicausale, impliquant de nombreux facteurs de stress potentiellement capables d'interagir entre eux. Ce travail s'intéresse à l'impact de deux facteurs de stress auxquels l'abeille est fréquemment exposée : le parasite microsporidien Nosema ceranae et les insecticides neurotoxiques (substances actives ou formulations phytopharmaceutiques), ainsi qu'à leurs interactions. Un effet synergique sur la mortalité des abeilles a été observé avec certaines combinaisons. N. ceranae et les insecticides ont également induit une modulation d'activités enzymatiques et du transcriptome de l'intestin moyen de l'abeille, avec des gènes impliqués dans l'immunité, la détoxication, l'intégrité épithéliale et neuronale et le cycle cellulaire. L'association Nosema-insecticide a spécifiquement induit une modulation de gènes du système ubiquitine-protéasome et de la phosphorylation oxydative. En outre, une perturbation des espèces bactériennes majoritaires du microbiote intestinal a été mise en évidence en réponse à ces facteurs de stress. Ces travaux ont ainsi démontré des interactions entre deux insecticides et entre parasite et insecticide, et proposent des hypothèses sur le mode d'action de ces interactions qui restent à vérifier à l'échelle individuelle et de la colonie.

Mots-clés : Apis mellifera, Nosema ceranae, insecticides neurotoxiques, interaction, synergie

## ABSTRACT

The honey bee, *Apis mellifera*, is a pollinator playing a major economic and ecological role. The losses of honeybee colonies observed in the recent decades reflect a more general decline of pollinators. The origin of this decline is believed to be multicausal, implying many stressors able to interact each other. This work focuses on the impact of two stressors frequently found in the honeybee, the microsporidian parasite Nosema ceranae and neurotoxic insecticides (active ingredients or phytopharmaceutical formulations), as well as their interactions. A synergistic effect on bee mortality has been observed with certain combinations. N. ceranae and the insecticides also induced a modulation of enzymatic activities and in the honeybee midgut transcriptome, with genes involved in immunity, detoxification, epithelial and neuronal integrity and cell cycle. The Nosema-insecticide combination specifically induced a modulation of genes of the ubiquitin-proteasome system and oxidative phosphorylation. In addition, a disturbance of the major bacterial species of the intestinal microbiota has been observed in response to these stressors. This work demonstrated interactions between insecticide formulations and between a parasite and two insecticides, and proposes hypotheses on the mode of action of these interactions which remain to be verified at the individual and colony scales.

Keywords : Apis mellifera, Nosema ceranae, neurotoxic insecticides, interaction, synergy

# TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	ii
Remerciements	VI
Abréviations	ix X
Liste des figures et tableaux	xi
CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	1
A. LE DÉCLIN DE L'ABEILLE, SENTINELLE DE L'ENVIRONNEMENT	3
A.1. Le déclin de l'abeille et des pollinisateurs	3
A.1.1. L'importance de la pollinisation et des abeilles	3
A.1.2. L'abeille à miel domestique Apis mellifera	5
A.2. Les pertes de colonies d'abeilles	6
A.3. Les facteurs de stress de l'abeille	7
A.3.1. Climat, paysage et ressources	8
A.3.2. Risques biotiques : la pathosphère de l'abeille	8
A.3.2.1. Les parasites	9
A.3.2.2. Les bactéries pathogènes : les loques	10
A.3.2.3. Les virus	10
A.3.2.4. Les autres ravageurs et prédateurs	11
A.3.3. Risques abiotiques : les contaminants environnementaux	12
A.3.4. Influence du fond génétique de l'abeille	12
B. LE SYSTÈME ABEILLE : DE L'HOLOBIONTE À LA SOCIÉTÉ	
P.1 La avala da via da l'abailla at da la galania	14
B.1. Le cycle de vie de l'abellie et de la colonie	
B.2. L'intestin de l'abeille	
B.2. L'intestin de l'abeille B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> </ul>	15 15 16
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colorie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> </ul>	15 15 16 16
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> </ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote</li> </ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote</li> <li>B.3.3. Les fonctions du microbiote</li> </ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote</li> <li>B.3.3. Les fonctions du microbiote</li> <li>B.4. Les défenses de l'abeille : immunité et détoxication</li> </ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote</li> <li>B.3.3. Les fonctions du microbiote</li> <li>B.4. Les défenses de l'abeille : immunité et détoxication</li> </ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote</li> <li>B.3.3. Les fonctions du microbiote</li> <li>B.4. Les défenses de l'abeille : immunité et détoxication</li> <li>B.4.1. La détoxication des xénobiotiques</li> <li>B.4.2. L'immunité individuelle : réponse humorale et réponse cellulaire</li> </ul>	15 
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li></ul>	14 15 15 16 16 16 16 16 17 18 19 19 19 19 19 
<ul> <li>B.1. Le cycle de l'abeille et de la colonie</li></ul>	15 
<ul> <li>B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de Vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>B.1. Le cycle de Vie de l'abeille et de la colonie.</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille.</li> <li>B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille.</li> <li>B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille.</li> <li>B.3. Le microbiote intestinal de l'ouvrière .</li> <li>B.3.1. La composition et l'organisation du microbiote intestinal .</li> <li>B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote .</li> <li>B.3.3. Les fonctions du microbiote .</li> <li>B.4. Les défenses de l'abeille : immunité et détoxication .</li> <li>B.4.1. La détoxication des xénobiotiques.</li> <li>B.4.2. L'immunité individuelle : réponse humorale et réponse cellulaire .</li> <li>B.4.3. L'immunité comportementale collective .</li> <li>C. Nosema ceranae, un parties émergent de l'abeille .</li> <li>C.2. N. ceranae, un parasite émergent de l'abeille .</li> <li>C.2. N. ceranae, et devenu la microsporidie majoritaire chez 4. mellifere.</li> </ul>	15 15 16 16 16 16 17 18 19 19 20 21 20 21 22 22 22 22 22 22 22 22 22
<ul> <li>B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	14 15 15 16 16 16 17 18 19 19 20 21 22 22 22 22 22 22 22 22 22
<ul> <li>b.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	
<ul> <li>b.1. Le cycle de la de la della colonie</li></ul>	
<ul> <li>b.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie</li></ul>	114 115 115 116 116 116 117 18 19 19 19 20 21 22 22 22 22 22 22 22 22 22
<ul> <li>b.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie.</li> <li>B.2. L'intestin de l'abeille</li></ul>	14 15 15 16 16 16 17 18 19 19 20 21 20 21 22 22 22 22 22 22 22 22 22

C.3.4. La prolifération et la différenciation intracellulaires	27
C.3.5. Le tropisme tissulaire	28
C.4. Les impacts de N. ceranae sur A. mellifera	28
C.4.1. Le détournement métabolique induirait un stress énergétique	28
C.4.2. La réponse immunitaire humorale	29
C.4.3. Un équilibre entre dégénérescence et renouvellement de l'épithélium	
C.4.4. L'équilibre hormonal : vers un butinage précoce des abeilles infectées	31
C.4.5. Les altérations du comportement et de la mémoire	31
C.5. <i>N. ceranae</i> et nosémose : mortalités et controverses	32
C.5.1. <i>N. ceranae</i> diminue la probabilité de survie des abeilles	32
C.5.2. Le rôle controversé de <i>N. ceranae</i> dans les pertes de colonies	
C.5.3. Les hypothèses sur la variation de la virulence de <i>N. ceranae</i>	33
D. LES INSECTICIDES NEUROTOXIQUES CHEZ L'ABEILLE	35
D.1. Historique et consommation actuelle	35
D.1.1. Vers des molécules synthétiques sélectives et actives à faible dose	35
D.1.2. Une consommation soutenue de pesticides dans le monde	36
D.2. Utilisation et modes d'action de quatre classes d'insecticides neurotoxiques	37
D.2.1. Les néonicotinoïdes : l'imidaclopride, le thiaméthoxame, le thiaclopride	37
D.2.1.1. Des agonistes des récepteurs de l'acétylcholine	37
D.2.1.2. Les insecticides systémiques les plus utilisés en agriculture	37
D.2.1.3. Impacts environnementaux et conséquences réglementaires	38
D.2.2. Un organophosphoré : le coumaphos	39
D.2.2.1. Un inhibiteur de l'acétylcholinestérase	39
D.2.2.2. Utilisation vétérinaire et restrictions d'usage	39
D.2.3. Un pyréthrinoïde : la deltaméthrine	40
D.2.3.1. Un modulateur des canaux sodium voltage-dépendants	40
D.2.3.2. Utilisation en agriculture et en santé humaine et animale	40
D.2.4. Un phénylpyrazole : le fipronil	41
D.2.4.1. Un antagoniste des récepteurs GABAR et GluCl	41
D.2.4.2. Utilisations comme traitement phytopharmaceutique et vétérinaire	41
D.3. Les voies d'exposition des abeilles aux insecticides	42
D.3.1. Les abeilles sont exposées aux pesticides lors des activités de butinage	42
D.3.2. Des acaricides sont introduits à l'intérieur des colonies	44
D.3.3. Les insecticides se retrouvent dans les matrices de la colonie	44
D.3.4. Toutes les abeilles de la colonie sont exposées de manière chronique	45
D.4. Les impacts des insecticides sur l'abeille	46
D.4.1. Des altérations physiologiques	46
D.4.1.1. L'activité acétylcholinestérase dans la tête	46
D.4.1.2. L'expression de gènes de détoxication	47
D.4.1.3. L'immunité de l'abeille	48
D.4.2. Une dégénérescence cellulaire dans l'intestin moyen et d'autres organes	48
D.4.3. Des altérations comportementales	49
D.4.3.1. Une hyperstimulation musculaires affectant les capacités motrices	49
D.4.3.2. Des capacités cognitives altérées	50
D.4.3.3. Une diminution de l'activité de butinage	51
D.4.3.4. Une perturbation de l'orientation et de la navigation des butineuses	51
D.4.3.5. Une communication moins précise : la danse des abeilles	52
D.4.3.6. Des comportements altérés chez les abeilles d'intérieur	52
D.4.4. Le renouvellement de la population de la colonie	53
D.4.4.1. Une diminution de la fertilité des castes reproductrices	53
D.4.4.2. Un développement retardé	53
D.4.5. Mortalités induites et importance dans les pertes de colonies	54
	iii

D.4.5.1. De faibles doses chroniques diminuent la longévité de l'abeille en laboratoire D 4 5 2 Mortalités et effondrements à l'échelle de la colonie	54
D.4.5.3. Les insecticides : un important facteur de risque dans les pertes de colonies ?	55
E. LES INTERACTIONS ENTRE FACTEURS DE STRESS	57
E.1. Les abeilles sont simultanément exposées à plusieurs facteurs de stress	57
E.2. Exemples d'interactions entre facteurs de stress	58
E.2.1. Interactions entre toxiques	58
E.2.2. Interactions entre pathogènes	59
E.2.3. Interactions entre pathogènes et toxiques	59
E.3. Les objectifs de la thèse	61
RESULTATS ET DISCUSSION	62
Avant-propos	63
F. THE HONEYBEE GUT MICROBIOTA IS ALTERED AFTER CHRONIC EXPOSURES TO DIFFERENT FAMILIES OF	
INSECTICIDES AND INFECTION BY NOSEMA CERANAE	65
F.1. Résumés	65
F.1.1. Résumé en français	65
F.1.2. Abstract	66
F.2. Introduction	66
F.3. Materials and Methods	67
F.3.1. Honeybee artificial rearing, infection with <i>N. ceranae</i> and chronic exposure to insecticides	67
F.3.2. Gut sampling and DNA purification	68
F.3.3. PCR quantification of bacterial taxa abundance	68
F.4. Results	69
F.5. Discussion	71
F.5.1. Seasonality of the honeybee microbiota and of stressor-induced variations	71
F.5.2. Alterations of the honeybee microbiota by the intestinal parasite <i>N. cerange</i>	71
F.5.3. Alterations of the honeybee gut microbiota by insecticides	72
F.5.4. A dysbiosis may sensitize the honeybee to other stressors	73
F.6. Acknowledgements and references	74
F.7. Informations supplémentaires	78
F.7.1. Résultats non publiés	78
F.7.1.1. Le microbiote des abeilles émergentes serait plus affecté	78
F.7.1.2. Le glyphosate affecte aussi le microbiote intestinal de l'abeille	78
F.7.2. Quelques nouveaux éléments de discussion	79
F.7.2.1. La variation saisonnière dépendrait d'autres facteurs comme les ressources	79
F.7.2.2. Le microbiote pourrait récupérer des perturbations induites par les néonicotinoïde	es.79
G. EFFECTS OF BINARY OR TERNARY MIXTURES CONTAINING THE PARASITE NOSEMA CERANAE AND	
INSECTICIDES FORMULATIONS ON THE HONEYBEE	81
G.1. Résumés	81
G.1.1. Résumé en français	81
G.1.2. Abstract	82
G.2. Introduction	82
G.3. Materiels and Methods	85
G.3.1. Honeybees and infection with <i>Nosema</i> spores	85
G.3.2. Intoxication with insecticides	86
G.3.3. RNA extraction from midgut	86
G.3.4. Gene expression analysis by RNA sequencing	86

G.3.5. Gene expression analysis by RT-QPCR	87
G.3.6. Enzyme activities	87
G.3.7. DNA extraction	88
G.3.8. Bacterial 16S sequencing	88
G.3.9. Quantification of bacterial taxa abundance by qPCR	89
G.4. Results and Discussion	89
G.4.1. Insecticides and parasite affect the honeybee survival at short and long term respectivel	y89
G.4.2. Proteus <sup>®</sup> and <i>N. ceranae</i> altered the midgut transcriptome more intensely when combine	d92
G.4.3. N. ceranae and Proteus <sup>®</sup> regulated genes involved in general functions	94
G.4.3.1. N. ceranae and Proteus <sup>®</sup> regulated the expression of detoxification genes	94
G.4.3.2. The parasite-Proteus <sup>®</sup> combination affected the ubiquitin-proteasome pathway	/95
G.4.3.3. N. ceranae, moreover in association with Proteus®, affected cell cycle and deat	n96
G.4.3.4. Proteus <sup>®</sup> alone may affect the visceral muscle integrity	97
G.4.3.5. <i>N. ceranae</i> and Proteus <sup>®</sup> altered the midgut tissue integrity	98
G.4.3.6. N. ceranae and insecticides may have contrasted effect on immunity	99
G.4.3.7. N. ceranae affected sugar and energy metabolism and oxidative phosphorylatic	n
was impaired by the combined parasite-Proteus <sup>®</sup> treatment	100
G.4.3.8. Lipid metabolism	101
G.4.3.9. Proteus <sup>®</sup> and <i>N. ceranae</i> affected synaptic and hormonal plasticity	102
G.4.4. The expression of selected genes was also regulated by Decis <sup>®</sup> and Calypso <sup>®</sup> by RT-QPCR	104
G.4.5. N. ceranae and Proteus <sup>®</sup> affected enzyme activities in the midgut and in the brain	105
G.4.6. Proteus <sup>®</sup> impacted <i>Lactobacillus</i> abundance in infected honeybees only	107
G.5. Conclusion	108
G.6. Acknowledgements and references	110
G.7. Résultats non publiés	118
G.7.1. Exposition préliminaire par contact à différentes doses de Proteus <sup>®</sup>	118
G.7.2. Effet d'une infection naturelle sur une expostion topique aux insecticides	118
G.7.2.1. Effet de l'infection sur des expositions topiques aigües à la deltamethrine	119
G.7.2.2. Dynamique d'une exposition aux insecticides sur cinq jours	119
	121
H 1 La plus forte sensibilité du microbiote chez les ouvrières émergentes et en hiver serait-ell	
factour aggravant à la sortio de l'hivernage 2	121
H 2 Comment expliquer la rénonse commune de certaines bactéries à différents facteurs de	1 2 1
stross ?	- 122
H 3 Pourquoi n'observe-t-on pas toujours une synergie entre N cerane et les insecticides ?	122
H 3 1 Le dévelonnement du nathogène	123
H 3.2 Formulation vs substance active : quels sont les effets des adjuvants ?	123
H 3 3 Les limites d'un modèle biologique mal contrôlé	12/
H 1 Comment expliquer la synargie entre facteurs de stress ?	124
H 4 1 La synergie deltaméthrine-thiaclonride	125
H $\Lambda$ 2 Oui de N cerange ou de l'insecticide sensibilise l'abeille à l'autre ?	125
H = 13 Le microhiote servit-il un facteur de synergie ?	125
H 4 A Quelles fonctions cellulaires influent sur l'interaction ?	125
H 4 4 1 La phoentrulation avudativa est-elle réduite par la combinaison parasite-insecticide	120
H $1.2$ Le système ubiquitine-protéesome est-il inhibé par le combinaison parasite-insecticide	2 126
H $1.4$ Le métabolisme des lipides est-il plus altéré en rénonse au double traitement ?	120
HAAA les fonctions intestinales sont-alles altérées par N carana et/ou les insecticides?	±27 107
H 5 Comment interagissent le parasite et les insecticides dans la colonie ?	±27 179
	±20
REFERENCES BILBIOGRAPHIQUES	129
ANNEXE	148

# **REMERCIEMENTS**

Je tiens tout d'abord à remercier Angélique Vétillard et Philippe Bulet pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et également Catherine Armengaud et Mahchid Bamdad pour avoir accepté d'intégrer mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Je remercie également mon co-directeur de thèse Luc Belzunces, pour ses conseils avisés mais aussi pour m'avoir ouvert les portes de l'INRAE d'Avignon et permis de travailler avec une fabuleuse équipe sous le soleil et le chant des cigales.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement Nicolas Blot, mon directeur de thèse mais aussi la personne qui m'a fait confiance, m'a soutenu et poussé à mon maximum pour aboutir à l'ensemble de ce travail. Tes conseils innombrables, ton aide incomparable mais aussi tes encouragements m'ont permis d'apprendre énormément à tes côtés. En m'emmenant avec toi à La Réunion, tu m'as aussi offert l'opportunité de travailler dans un cadre incroyable et de rencontrer des gens formidables. Nico, c'est terrible à dire mais tu es presque la personne avec laquelle j'ai passé le plus de temps ces trois dernières années... c'est sans doute la raison qui nous a valu le surnom de tic-et-tac !

Un grand merci à Frédéric Delbac et à tous les membres de l'équipe IHP pour m'avoir accueilli pour mon doctorat mais aussi pour mon Master 2 qui a été à l'origine de ce choix de continuer en thèse avec vous ! Anne, je te remercie en particulier puisque tu as été la personne qui a le plus contribué à mon travail au LMGE.

Je remercie également tous les thésards et Master 2 du LMGE avec qui j'ai partagé de bons moments (et pas seulement au Nota !). J'en profite pour te remercier Loïs – alias le gendre parfait – car travailler à tes côtés pendant ton stage a été très agréable, mais comme tu as aussi décidé de te lancer dans l'aventure je te souhaite bon courage, tu en auras besoin... Chafika j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi à l'occasion de ton stage de Master 2, d'autant que tu nous as un peu ramené un bout de La Réunion au labo !

Je souhaite remercier Bernard Reynaud pour son accueil au CIRAD de Saint-Pierre ainsi que Hélène Delatte et Olivier Esnault pour m'avoir permis de rejoindre leur équipe. Évidement je remercie aussi Nicolas Cazanove, Bernard, Abal, Angélique et tous les autres pour leur aide précieuse sur le terrain et au labo ! Toujours à La Réunion, je n'oublie pas Nico Le Perse et Alizée (et son Nathan), avec qui j'ai partagé douleurs et souffrances à -5°C ou 40°C, mais surtout des escapades inoubliables sur l'île.

Je remercie toute l'équipe de Luc à Avignon et tout particulièrement Déborah et Sylvie pour leurs coups de mains indispensables dans mes manips interminables. Mention spéciale pour Sylvie, la véritable maman de toute l'Unité (tu vas vraiment leur manquer !), mais aussi pour

Marc et Tigrane pour avoir accepté d'accueillir un pauvre thésard sans domicile en lui ayant préparé plus d'un mois de stock de nourriture !

Merci à toi Élisa, pas seulement pour ton aide mais aussi pour les moments qu'on a passés ensemble pendant cette période à Avignon. Julien, avec toute l'aide que tu m'as apportée pendant ces mois à Avignon, tu aurais mérité plus que des remerciements, mais au moins ça nous aura fait de beaux souvenirs, travailler avec toi ce n'est pas commun ! Sans vous deux ça n'aurait pas été la même mes petits ! (Love).

Les copains, je pense à vous car je sais que vous serez là le jour J pour la soutenance. Ça me va droit au cœur même si je sais pertinemment que vous allez prendre un malin plaisir à me voir transpirer à la soutenance.

Maman, Papa, Hélo, merci pour votre soutien inconditionnel, vous êtes une famille incroyable et je sais que je pourrai toujours compter sur vous. Vous êtes mon retour aux sources indispensable. C'est évidemment aussi grâce à vous que j'ai pu arriver jusqu'ici. Je vous aime fort. (Poutou). Ma Mamie, je pense à toi aussi en écrivant ces lignes, tu es partie peu de temps avant l'accomplissement de ces trois ans et demi de travail où j'ai été moins présent auprès de toi mais tu resteras à jamais dans mon cœur.

Ma Manon, mon petit cœur, je sais que cela n'a pas été facile pour toi tous les jours et que tu as fait d'énormes concessions quand cela a été l'heure du départ. Pourtant tu as toujours été là pour moi, pour m'aider, me soutenir. Tu en as fait énormément pour moi, en particulier ces derniers mois, et j'en suis conscient, tu es une fille extra ! Et puis il y a aussi eu les retrouvailles, les belles découvertes, des expériences inoubliables et maintenant de toutes nouvelles perspectives qui se dessinent et que j'ai hâte de partager avec toi ! Merci encore mon amoureuse. Je t'aime.

Merci Alex pour tes bons plans biblio...

## **PRODUCTION SCIENTIFIQUE**

#### **Publications Scientifiques**

**Régis Rouzé, Anne Moné, Frédéric Delbac, Luc Belzunces & Nicolas Blot** (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposures to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae. Microbes and Environments* 34(3), 226-233.

Régis Rouzé, Anne Moné, Sylvie Tchamitchian, Frédéric Delbac, Olivier Esnault, Hélène Delatte, Luc Belzunces & Nicolas Blot. Effects of binary or ternary mixtures containing the parasite *Nosema ceranae* and insecticides formulations on the honeybee. *In Press*.

**Nicolas Blot, Loïs Veillat, Régis Rouzé & Hélène Delatte** (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLoS ONE* 14(4): e0215466.

#### **Communications Orales**

**Rouzé R**. Impact de facteurs de stress et de leurs interactions sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*. **5**<sup>ème</sup> **Journée des Doctorants du LMGE** – Clermont-Ferrand, France – 16 mars 2017.

Rouzé R, Moné A et Blot N. Altérations du microbiote intestinal de l'abeille domestique après exposition à des doses sublétales d'insecticides et une infection par *Nosema*. Présentation de Poster – Journée de l'École Doctorale – Clermont-Ferrand, France – 14 et 15 juin 2018.

**Rouzé R**. Impact des facteurs de stress et de leurs interactions sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*. **Animation Scientifique du PVBMT** – CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion – 13 septembre 2018.

**Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N**. Altérations du microbiote intestinal de l'abeille domestique après exposition à des doses sublétales d'insecticides et une infection par *Nosema ceranae*. **16**<sup>ème</sup> **Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois** – Clermont-Ferrand, France – 9 avril 2019.

**Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N.** Impact and interactions of *Nosema ceranae* and neurotoxic insecticides on the honeybee, *Apis mellifera*. **7**<sup>ème</sup> **Journée des Doctorants du LMGE** – Clermont-Ferrand, France – 3 mai 2019.

**Rouzé R**. Alterations of the honeybee gut microbiota following chronic exposure to pesticides and an infection by *Nosema ceranae*. **Society for Invertebrate Pathology/IOBC Congress** – Valencia, Espagne – 28 Juillet au 1<sup>er</sup> août 2019.

# **ABRÉVIATIONS**

Les acronymes et les abréviations utilisés dans le langage courant étant souvent maintenus depuis leur version anglaise (on utilise la PCR et non la RPC), le choix a été fait de conserver certains acronymes en anglais tout en précisant leur traduction française dans le texte.

ab	abeille, utilisé en unité (par ex. ng/ab/j)
ABPV	Acute Bee Paralysis Virus
ACh	acétylcholine
AChE	acétylcholinestérase
a.i.	ingrédient actif (active ingredient)
AMP	peptide antimicrobien (antimicrobial peptide)
AP	phosphatase alcaline (alcaline phosphatase)
BQCV	Black Queen Cell Virus
C <sub>0:20</sub>	Calvpso®
CBPV	Chronic Bee Paralysis Virus
СОМ	coumaphos
СҮР	mono-oxygénase à cytochrome P450 ( <i>cytochrome P450 monooxygenase</i> )
D <sub>2:0</sub>	Décis®
DC <sub>2:20</sub>	mélange Décis <sup>®</sup> + Calypso <sup>®</sup>
DWV	Deformed Wing Virus
EO	oléate d'éthyle (ethyl oleate)
FIP	fipronil
GABA	acide y-aminobutyrique
GABAR	récepteur ionotrope à GABA
GluCIR	récepteur ionotrope à glutamate
GP	glutathion péroxydase (glutathione peroxidase)
GST	glutathion-S-transférase (glutathione-S-transferase)
IAPV	Israeli Acute Paralysis Virus
IC <sub>95</sub>	intervalle de confiance à 95% ( $\alpha$ =0,05)
IMI	imidaclopride
JH	hormone juvénile ( <i>juvenile hormone</i> )
LAB	bactéries lactiques (lactic acid bacteria)
LD <sub>50</sub>	dose létale (lethal dose) médiane tuant 50% des individus en un temps donnée (en général 24 h)
nAChR	récepteur nicotinique de l'acétylcholine
Ν	Nosema ceranae
OC	oral et chronique (concentrations en masse par masse ou par volume de sirop de saccharose)
P <sub>0.5:5</sub> , P <sub>1:1</sub>	10, P2:20 Protéus <sup>®</sup> (à trois doses différentes de deltaméthrine et thiaclopride)
PCR	réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
QPCR	réaction de polymérisation en chaîne quantitative (quantitative PCR)
PER	réflexe d'extension du proboscis (proboscis extension response)
PGRP	récepteurs de reconnaissance du peptidoglycane (peptidoglycan receptor protein)
ROS	espèces réactives de l'oxygène ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	transcription ou transcriptase inverse inverse (reverse transcription or transcriptase)
s.a.	substance active (même chose que a.i.)
SBV	SacBrood Virus
SNC	système nerveux central
SOD	superoxide dismutase
ТМХ	thiaméthoxame
UPS	système ubiquitine-protéasome (ubiquitin-proteasome system)
Vg	vitellogénine

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## Chap. A-E. Contexte bibliographique

en face p.

Figure 1. Quelques pollinisateurs d'importance dans le monde	2
Figure 2. Proportions de cultures selon leur dépendance à la pollinisation	3
Figure 3. Contribution de groupes d'insectes aux visites de fleurs	3
Figure 4. Phylogénie des hyménoptères	4
Figure 5. Evolution et répartition des lignées d'Apis mellifera	5
Figure 6. Évolution du nombre de colonies d'A. mellifera	6
Figure 7. Les mortalités de colonies en Europe	7
Figure 8. Les pathogènes et ravageurs de l'abeille	8
Figure 9. Cycle de vie de Varroa	9
Figure 10. Les spores des Nosema de l'abeille	10
Figure 11. Les pesticides retrouvés dans les colonies d'abeilles	12
Figure 12. Interactions entre les facteurs intervenant dans les pertes de colonies d'abeilles	13
Figure 13. Morphologie et développement des trois castes d'A. mellifera	14
Figure 14. Le polyéthisme d'âge	14
Figure 15. Anatomie de l'abeille	15
Figure 16. Coupe de l'intestin moyen d'une abeille au microscope	16
Figure 17. Coupes de l'intestin moyen au microscope électronique à balavage	16
Figure 18. L'intestin de l'abeille et ses communautés bactériennes	17
Figure 19. Activités métaboliques du microbiote core	18
Figure 20. Protection contre les pathogènes par le microbiote intestinal	18
Figure 21. Mécanismes de détoxication des xénobiotiques	19
Figure 22. Voies de signalisation de l'immunité humorale de l'abeille	20
Figure 23. Position et classification phylogénétiques des microsporidies	22
Figure 24. Processus expliquant la compaction du génome microsporidien	23
Figure 25. Proportion de séquences codantes, non codantes et répétées dans les génomes	23
Figure 26. Distribution de <i>N. ceranae</i> dans différentes espèces hôtes	24
Figure 27. Structure d'une spore de microsporidie	25
Figure 28. Cycle de vie de <i>N. ceranae</i>	26
Figure 29. Possibles voies d'invasion d'une cellule hôte par <i>N. cerange</i>	27
Figure 30. Infection des cellules épithéliales de l'intestin moyen	28
Figure 31. N. cerange induit une chute du taux de tréhalose dans l'hémolymphe	28
Figure 32. Modulation de l'expression de gènes de l'immunité lors d'une infection par N. cerange	29
Figure 33. N. ceranae inhibe la prolifération des cellules souches	30
Figure 34. N. ceranae inhibe l'apoptose des cellules épithéliales de l'intestin moyen	30
Figure 35. Le réflexe d'extension du proboscis	31
Figure 36. Modifications du comportement de butinage par N. cerange	32
Figure 37. Controverse sur le lien etre N. cerane et les effondrements de colonies	33
Figure 38. Evolution de l'utilisation des classes d'insecticides	36
Figure 39. Les insecticides les plus utilisés entre 1990 et 2012	36
Figure 40 : Modes d'action des insecticides neurotoxiques	37
Figure 41. La LD <sub>50</sub> : courbes dose-mortalité	38
Figure 42. LD <sub>50</sub> par famille d'insecticides chez l'abeille mellifère	38
Figure 43. Les modèles d'exposition des abeilles aux insecticides	42
Figure 44. Répartition du temps d'activité d'abeilles exposées au coumaphos	50
Figure 45. Activité de butinage d'abeilles exposées aux insecticides	51
Figure 46. Mortalité d'abeilles devant des colonies exposées à un traitement insecticide	55
Figure 47. Nombre de molécules de pesticides dans des colonies transhumantes	57
Figure 48. Nombre de virus différents détectés dans les abeilles	57
Figure 49. Synergie entre N. ceranae et le fipronil sur la mortalité des abeilles	59
Tableau I. Pourcentage de la production dépendente de la pollipisation par A. mellifera	5
Tableau II Les virus de l'abeille	
Tableau III Concentrations de métaux lourds dans le miel	<u>.</u> 1२
Tableau IV Caractéristiques de génomes microsnoridiens	
Tableau V Les grandes étanes de l'utilisation des insecticides en agriculture	25
Tableau VI Les dix plus gros consommateurs de pesticides et d'insecticides	35
Tunicua VII Les un plus gros consommateurs de pesticides et à insecticides	

	en face p.
Tableau VII. Quelques données sur les insecticides	
Tableau VIII. Résidus insecticides dans trois matrices de colonies	44
Tableau IX. Estimation du risque de mortalité d'ouvrières du aux insecticides	56

#### Chap. F. Article Rouzé et al. (2019) Insecticides, Nosema & bee gut symbionts

Figure 1. Comparison of the abundances of the major bacterial taxa in the gut microbiota between summer and winter honeybees	70
Figure 2. Abundance of the major taxa in the gut microbiota of pesticide-exposed or <i>N. ceranae</i> -infected honeybees	71
Suppl. Figure S1. Sucrose and insecticide consumption of honeybees chronically exposed to insecticides or infected with Nosema ceranae	73-74
Suppl. Figure S2. Cumulative proportion of surviving honeybees chronically exposed to insecticides or infected with spores of <i>Nosema ceranae</i>	73-74
Suppl. Figure S3. Principal component analysis of QPCR data	73-74
Suppl. Figure S4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis profiles of total bacterial and Neisseriaceae-specific 16S rDNA fragments present in the gut microbiota from	
uninfected and N. ceranae-infected honeybees	73-74
Suppl. Figure S5. Abondance relative de taxa majoritaires du microbiote en réponse à	
N. ceranae et à trois insecticides chez des abeilles émergentes	73-74
Table 1. Primer pairs tested for the QPCR quantification of the honeybee microbiota major	60

#### Chap. G. Article Rouzé et al. (in prep) Nosema-insecticides mixtures in honeybee

Figure 1. Proportion of honeybee mortality in response to N. ceranae and/or Proteus®,	
or to N. ceranae, Décis <sup>®</sup> and/or Calypso <sup>®</sup>	90
Figure 2. Parasite success of <i>N. ceranae</i> by counting the spores present in the abdomen	91
Figure 3. Daily sucrose consumption of honeybees	92
Figure 4. Protein content and activities GTS, CAT and AP in the midgut of honeybees	105
Figure 5. Protein content and activities GST, CAT, GP and AChE in the head of honeybees	106
Figure 6. Response of the gut microbiota to <i>N. ceranae</i> , Proteus <sup>®</sup> and their combination	107
Suppl. Figure S1. Cumulative proportion of surviving	
Suppl. Figure S2. Principal Component Analyses using the expressed or differentially	
expressed transcripts	
Suppl. Figure S3. Unweighted pair-group average and Neighbor joining hierarchical analyses	
of the 1098 differentially expressed transcripts	
Suppl. Figure S4. Repartition of transcripts modulated by <i>N. ceranae</i> or Proteus®	
in the presence and absence of the other one	109-110
Suppl. Figure S5. Repartition of transcripts modulated by <i>N. ceranae</i> and by Proteus <sup>®</sup>	
whatever the presence or absence of the other one	109-110
Suppl. Figure S6. Mean expression level of transcripts	109-110
Suppl. Figure S7. Response of the gut microbiota to N. ceranae, Proteus® and their	
combination in each colony	109-110
Suppl. Figure S8. Proportion of four of the major bacterial groups in honeybees infected	
by <i>N. ceranae</i> and/or exposed to Decis <sup>®</sup> , Calypso <sup>®</sup> or both formulations	
Suppl Figure S9. Mortalité d'abeilles suite à une exposition aigüe de contact au Proteus <sup>®</sup>	118
Table 1. Concentrations of active ingredients	
Table 2. Differentially expressed transcripts in response to N. ceranae and/or Proteus <sup>®</sup>	94-104
Suppl. Table S1. Primer pairs used in this study for quantitative PCR on transcripts	
Suppl. Table S2. The 1098 differentially expressed genes	sur demande
Suppl. Table S3. Non-parametric multivariate analyses	

# CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1. Quelques pollinisateurs d'importance dans le monde. Les images figurant dans des cercles représentent des espèces domestiquées. D'après Potts et al. (2016).



**Figure 2. Proportions de cultures selon leur dépendance à la pollinisation**. Plus d'une centaine de cultures productrices de fruits ou de graines et pollinisées, au moins en partie, par les animaux ont été considérées. Elles ont été séparées en plusieurs catégories : *Essential* (plus de 90% de perte de rendement sans les pollinisateurs), *High* (40-90), *Modest* (10-40%), *Little* (0-10%), *Independent* (sans effet), et *Unknown* (données manquantes). Des exemples de cultures sont indiqués. D'après les données de Klein *et al.* (2007) et Ghosh & Jung (2016).



**Figure 3. Contribution de groupes d'insectes aux visites de fleurs** sur une sélection de cultures, à partir de données compilées de 37 études. Les contributions d'*A. mellifera* (39% des visites, intervalle de confiance 29-49%), des autres abeilles (23%, 13-33%) et des insectes non-abeilles (38%, 29-50%) ne sont pas significativement différentes sur l'ensemble des données. D'après Rader *et a*l. (2016).

# A. LE DÉCLIN DE L'ABEILLE, SENTINELLE DE L'ENVIRONNEMENT

On observe depuis plusieurs décennies d'importantes pertes de colonies d'abeille mellifère (*Apis mellifera*) un peu partout dans le monde. Ces pertes sont le reflet du déclin plus global de l'ensemble des insectes pollinisateurs et de l'entomofaune en général. Or, les pollinisateurs jouent un rôle majeur dans l'équilibre de la biodiversité, dans les productions agricoles, et dans les activités apicoles dans le cas d'*A. mellifera*. Malgré un intérêt accru de la communauté scientifique, il est actuellement difficile d'identifier avec exactitude des causes spécifiques à ce déclin. L'abeille étant soumise à une variété de facteurs de stress, l'origine des pertes de colonies serait multicausale, impliquant notamment des interactions entre ces facteurs.

# A.1. Le déclin de l'abeille et des pollinisateurs

## A.1.1. L'importance de la pollinisation et des abeilles

La reproduction sexuée de la majorité des plantes sauvages et cultivées dépend de la pollinisation (Ollerton *et al.*, 2011). Les insectes pollinisateurs ne sont pas les seuls à jouer ce rôle (il y a l'autogamie, l'anémogamie, la pollinisation par les oiseaux et les mammifères, **Fig. 1**) mais leur activité, et en particulier celle des abeilles, est considérée comme dominante (Klein *et al.*, 2007 ; Ollerton *et al.*, 2011 ; Ollerton, 2017 ; Hung *et al.*, 2018). La pollinisation par les insectes est aussi importante pour le rendement des cultures agricoles que l'est la qualité des variétés cultivées (**Fig. 2** ; Fijen *et al.*, 2018). Le poids **économique** des pollinisateurs est colossal. La valeur annuelle des services de pollinisation a été évaluée entre 200 et 500 milliards de dollars entre 2009 et 2018, soit près de 10% de la valeur des productions agricoles mondiales (Gallai *et al.*, 2009 ; Lautenbach *et al.*, 2012 ; Quigley *et al.*, 2019).

La dépendance des plantes vis-à-vis des différents insectes est variable, depuis les plantes polytropes, visitées par un grand nombre d'espèces, jusqu'aux espèces monotropes, dépendantes d'un seul pollinisateur (**Fig. 3**). Par exemple, la pollinisation de l'orchidée *Caladenia huegelii* dépendrait presque exclusivement d'une sous-espèce de guêpe solitaire, *Macrothynnus insignis* (Phillips *et al.*, 2015). Cette spécialisation existe également chez les pollinisateurs, certains étant attirés par un nombre réduit d'espèces florales (Kjellberg *et al.*, 1987 ; Ollerton *et al.*, 2017 ; Hung *et al.*, 2018), d'où l'interconnexion entre biodiversité des pollinisateurs et des plantes à fleurs. L'équilibre de cette relation mutualiste illustre le rôle majeur de ces insectes à la fois dans notre économie et dans l'équilibre des **écosystèmes**.

On estime que les abeilles contribuent de façon particulièrement importante à la pollinisation des cultures (Klein *et al.,* 2007). Les abeilles et les guêpes apoïdes constituent la superfamille des Apoideae, au sein de l'ordre des Hyménoptères (**Fig. 4** ; Debevec *et al.,* 2012). Elles



**Figure 4. Phylogénie des hyménoptères.** Cette analyse phylogénomique été construite sur 854 *loci*. Les points noirs indiquent les nœuds retrouvés dans toutes les analyses mais avec une robustesse <90% dans au moins une d'entre elles. Les points blancs indiquent un conflit entre analyses. Les étoiles indiquent les estimations de datation de divergence de différents clades. Les Apidae sont indiqués par une flèche verte. Branstetter *et al.* (2017).



**Figure 5. Evolution et répartition des lignées d'***Apis mellifera.* **A.** Hypothèses évolutives des lignées majeures avec (i) une expansion depuis le Moyen-Orient et une colonisation de l'Europe par deux routes, (ii) une expansion depuis le Moyen-Orient et une colonisation de l'Europe par une seule route septentrionale et (iii) une expansion depuis l'Afrique et une colonisation de l'Europe par deux routes. D'après Han *et al.*, 2012. **B.** Répartition des sous-espèces d'*Apis mellifera*. Les sous-espèces des lignées M, C, A et O sont respectivement indiquées en bleu, vert, rouge et jaune. Les types Y et Z, proches des lignées A et O, se démarquent par une variation de leur ADN mitochondrial. D'après Moritz *et al.* (2005) avec les données de Techer *et al.* (2017) et Alburaki *et al.* (2013).

Tableau I. Pourcentage de la production dépendante de la pollinisation par A. mellifera d'unesélection d'espèces cultivées. D'après Hafi et al. (2012)

Culture	% dépendance	Culture	% dépendance	Culture	% dépendance
Amande	100	Cerise	81	Mandarine	27
Avocat	90	Noix	81	Orange	27
Cantaloup	90	Kiwi	72	Citron	18
Colza (graine)	90	Mangue	72	Papaye	16
Concombre	90	Pamplemousse	72	Colza	14
Framboise	90	Pastèque	63	Citrouille	10
Légumes (grains)	90	Prune	63	Lupin	10
Luzerne	90	Abricot	56	Coton	8
Myrtille	90	Nectarine	48	Haricot	5
Tournesol	90	Poire	45	Soja	5
Courgette	90	Pêche	48	Fraise	4
Pomme	81	Pois	45	Arachide	2

comprennent plus de 20 000 espèces, dont plus de 90% sont pollinisatrices. Parmi elles, le clade des Anthophila regroupe les espèces d'abeilles. Ce clade comprend notamment la famille des **Apidae**, considérée comme la plus abondante et la plus diversifiée. Elle est ellemême subdivisée en 19 sous-familles au moins et compte plus de 5 600 espèces, dont les abeilles à miel, les abeilles coucou, les abeilles charpentières et les bourdons (Hedtke *et al.,* 2013 ; ITIS, 2020). La plupart de ces espèces sont sauvages et solitaires et leur importance est loin d'être négligeable puisqu'elles participeraient à la pollinisation d'environ 80% des grandes cultures (Goulson, 2003 ; Ollerton *et al.,* 2017 ; Hung *et al.,* 2018). Leur rôle est primordial chez certaines plantes à fleurs (par ex. les cucurbitacées), pour lesquelles la seule pollinisation par les abeilles domestiques est insuffisante (Fijen *et al.,* 2018 ; Hung *et al.,* 2018 ; MacGrady *et al.,* 2020). La contribution de chaque espèce d'abeilles reste cependant inégale. Quelques espèces, comme *A. mellifera*, sont à la fois dominantes et généralistes, visitant la majorité des cultures (**Fig. 3** ; Kleijn *et al.,* 2015).

Le nombre d'espèces d'abeilles domestiquées est faible et comprend plutôt des pollinisateurs généralistes. Ce sont toutes des Apidae, avec l'abeille européenne (*Apis mellifera*), l'abeille asiatique (*Apis ceranae*), quelques espèces de bourdons (genre *Bombus*), quelques espèces de mélipones (« stingless bees », genre *Melipona*) et des essais sur des abeilles charpentières (genre *Xylocopa*). Seuls les genres *Apis* et *Melipona* sont utilisés pour la production de miel.

## A.1.2. L'abeille à miel domestique Apis mellifera

L'abeille domestique (*Apis mellifera*) comprend de nombreuses lignées et sous-espèces dont les origines sont encore discutées (**Fig. 5A** ; Han *et al.*, 2012 ; Alburaki *et al.*, 2013 ; Cridland *et al.*, 2017). Une sous-espèce bien acclimatée à une région, où elle sera considérée comme plus productive ou plus résistante, ne le sera pas forcément dans une autre région où elle aurait été importée. On compte plus d'une vingtaine de sous-espèces d'*A. mellifera* actuellement regroupées en 5 ou 6 **lignées** sur des critères morphologiques, biologiques et génétiques (**Fig. 5B** ; Cridland *et al.*, 2017).

*A. mellifera* présente un fort **intérêt économique** grâce la production de miel et d'autres produits de la ruche (cire, pollen, gelée royale, propolis), mais surtout grâce aux services à la pollinisation. Elle est considérée comme l'une des espèces les plus efficaces pour la pollinisation, étant même indispensable pour de nombreuses cultures dont elle est le principal pollinisateur (Tab. I, Fig. 3 ; Perrot *et al.,* 2019). Elle présente d'importantes capacités de collecte de ressources et un fort rendement de visite de fleurs (Decourtye *et al.,* 2016). On estime que, dans des conditions climatiques optimales, une seule abeille peut effectuer plus de 50 vols par jour, visitant à chaque sortie entre 50 et 500 fleurs (Abrol, 2013). L'effectif important des colonies, qui peut dépasser les 60 000 individus en pleine saison, et son périmètre d'activité autour de la colonie large de plusieurs kilomètres, expliquent en partie leur considérable rendement (Hagler *et al.,* 2011 ; Abrol, 2013). Cependant l'organisation



**Figure 6. Évolution du nombre de colonies d'***A. mellifera***. A.** Taux annuel (%) de la croissance du nombre de colonies d'abeilles pour les pays ayant rapporté leurs données à la FAO entre 1961 et 2012. **B.** Estimation du nombre de colonies dans le monde entre 1961 et 2018 (en million). **C.** Estimation du nombre de colonies aux Etats-Unis dans la même période. D'après Potts *et al*. (2016).

sociale de la colonie participe également à son efficacité, avec un partage des taches (polyéthisme) selon l'âge et la caste de l'abeille.

La commercialisation pour ses services en apiculture et en agriculture fait que l'on retrouve désormais *A. mellifera* sur l'ensemble des continents et que sa population globale est en augmentation. On dénombrait plus de 90 millions de colonies d'abeilles domestiques dans le monde en 2018, soit une augmentation d'environ 38,5 % en 20 ans et de 75,5% en 50 ans (**Fig. 6**; FAOSTAT, 2018). Cependant, les données sont très variables d'une région à l'autre. Entre 1961 et 2017, le nombre de colonies a augmenté en Asie, en Afrique et en Amérique du Sud alors qu'il a diminué en Amérique du Nord, en Europe et en Russie (FAOSTAT, 2020 ; Potts *et al.,* 2016). La hausse du nombre des colonies d'abeille ne suffit cependant pas à répondre aux besoins puisque la production agricole dépendante de la pollinisation ne cesse elle aussi d'augmenter (+300% sur les 50 dernières années, Aizen & Harder, 2009), en particulier dans le bassin méditerranéen, en Amérique du Nord et du Sud, en Asie continentale et de l'Est (Potts *et al.,* 2016).

A. mellifera présente également un fort **intérêt écologique**, en participant à la pollinisation de nombreuses espèces et au maintien de la biodiversité. Elle est en outre un bioindicateur de la qualité de l'environnement, capable d'apporter de nombreuses informations à travers l'analyse des ressources récoltées et des polluants présents dans les matrices de la colonie (pollen, miel, gelée royale, cire, propolis, abeilles), à travers l'état de santé des colonies et l'étude de leur comportement, de leur fonctionnalité et de leur productivité (Celli & Maccagnani, 2003 ; Quigley, 2019). De plus, elle est présente dans des milieux très divers, partout dans le monde, et reste constamment sous la surveillance des apiculteurs. Elle constitue ainsi un modèle d'étude en recherche environnementale.

# A.2. Les pertes de colonies d'abeilles

La stabilité des populations de pollinisateurs est primordiale au vu de leur importance écologique et économique. La multiplication des publications évoquant un déclin de leurs populations depuis les années 90 a placé ce sujet sur le devant de la scène (Allen-Warden *et al.,* 1998 ; Ollerton *et al.,* 2011). Ce déclin s'observe par la diminution de l'**abondance** et de la **diversité** des espèces et touche l'ensemble des insectes pollinisateurs (Potts *et al.,* 2010a ; Cameron & Sadd, 2020). En Angleterre et aux Pays-Bas, un parallèle a aussi été observé entre ce déclin et une baisse de la diversité de plantes à fleurs (Biesmeijer *et al.,* 2006).

D'importantes pertes ont notamment été observées chez *A. mellifera*. L'évolution du nombre de colonies exploitées (**Fig. 6B**) n'est pas un paramètre qui permet d'estimer les pertes subies puisque qu'il reflète plus globalement l'état global de la filière apicole, avec l'influence du nombre d'apiculteurs professionnels ou amateurs, de la taille de leur cheptel, de leur capacité à remplacer des colonies perdues, *etc*. Pendant longtemps, chaque état utilisait sa propre méthodologie pour évaluer les pertes de colonies, rendant difficile une vision globale du


**Figure 7. Les mortalités de colonies en Europe.** Proportions moyennes de mortalités de colonies lors de l'hiver 2012-2013 **(A)** et de la saison apicole au printemps-été 2013 **(B)** dans 17 pays européens. BE Belgique, SE Suède, EN&WA Angleterre et Pays de Galles, EE Estonie, FI Finlande, LV Lettonie, PL Pologne, DK Danemark, FR France, PT Portugal, DE Allemagne, HU Hongrie, ES Espagne, SK Slovaquie, GR Grèce, LT Lituanie, IT Italie. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95%. D'après Chauzat *et al.* (2016).

déclin des abeilles. Les principales études concertées ont été menées aux États-Unis et en Europe, où les pertes saisonnières varient fortement selon les états (vanEngelsdorp, 2008).

En Europe, le nombre de colonies et d'apiculteurs a diminué de 16% et 31% respectivement entre 1985 et 2005, avec des régions plus touchées comme l'Europe centrale (Potts *et al.,* 2010b). En 2012-2013, les pertes de colonies dans 17 pays européens ont montré une grande variabilité, avec des **pertes hivernales** représentant 4,7 à 30,6% du cheptel (pour des pertes considérées comme acceptables en dessous de 10%) et, de façon inattendue, jusqu'à 10,6% de pertes en **saison apicole (Fig. 7**; Chauzat *et al.,* 2016). Si l'hivernage est une période délicate pour les colonies, qui se maintiennent grâce aux réserves accumulées durant la saison apicole, les pertes observées sont supérieures à celles uniquement attribuables aux conditions hivernales.

Aux États-Unis le bilan est alarmant. Le nombre de colonies a été réduit de moitié entre 1961 et 2018 (**Fig. 6C**; FAOSTAT, 2020; vanEngelsdorp *et al.*, 2010). Cette chute a été accompagnée par des pertes de colonies qui, entre 2006 et 2016, s'élevaient en moyenne entre 34 et 45% chaque année, avec 22 à 36% de pertes à la sortie de l'hivernage et des chiffres étonnamment proches durant la saison apicole (de 24 à 25%, Kulhanek *et al.*, 2017). À la fin des années 2000, une partie des pertes observées fut associée au syndrome d'effondrement des colonies ou "**Colony Collapse Disorder**" (CCD). Le CCD se caractérise par une disparition rapide des ouvrières dans les colonies, sans cadavres observés à proximité, ne laissant que la reine et quelques jeunes abeilles malgré la présence d'importantes réserves de miel et de pollen (vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Sans pouvoir attribuer ce syndrome à un facteur de stress précis, des liens ont été suggérés avec certains pathogènes ou la présence de pesticides (Cox-Foster *et al.*, 2007; vanEngelsdorp *et al.*, 2009). C'est dans ce contexte que la communauté scientifique s'est intéressée à l'origine des pertes de colonies.

# A.3. Les facteurs de stress de l'abeille

L'abeille est soumise à une variété de facteurs de stress et les scientifiques ont longtemps cherché à déterminer lesquels pouvaient être associés aux disparitions de colonies. Quelques agents pathogènes ou parasites, comme *Varroa*, ou certaines familles de pesticides, comme les néonicotinoïdes, sont considérés comme des facteurs de risque majeurs pour les abeilles (Neumann & Carreck, 2010; Van Esch *et al.*, 2020). Cependant aucun facteur de stress n'explique à lui seul l'ampleur des pertes enregistrées. Celles-ci auraient plutôt une **origine multicausale**, n'impliquant pas toujours les mêmes facteurs ou impliquant la combinaison de certains d'entre eux (vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2010a; Goulson *et al.*, 2015). En effet certains facteurs de stress s'avèrent être plus néfastes lorsqu'ils sont associés que lorsqu'ils sont étudiés individuellement.



**Figure 8. Les pathogènes et ravageurs de l'abeille. a**. Acarien *Varroa destructor* présent sur le thorax d'une butineuse (flèche). **b**. Deux cellules flagellées de trypanosomes *Lotmaria passim* au microscope électronique à balayage. **c**. Infestation d'un cadre de ruche par des larves de petit coléoptère *Aethina tumida*. **d**. Abeille atteinte par le virus des ailes déformées (DWV) et parasitée par deux femelles *V. destructor* (flèches), principal vecteur de la maladie. **e**. "Test de l'allumette" caractéristique de la liquéfaction visqueuse (flèche) d'une larve d'*A. mellifera* décomposée à la suite d'une infection par la loque Américaine *Paenibacillus larvae*. **f**. Larve d'abeille infectée par le champignon *Ascophaera apis* (indiqué par la flèche), responsable de la maladie du couvain plâtré (en blanc). **g**. Acariens *Acarapis woodi* parasitant la trachée d'une abeille. **h**. Larve de mouche parasitoïde *Apocephalus borealis* émergeant du thorax d'une abeille parasitée. D'après Brosi *et al.* (2017) et Schwarz *et al.* (2015).

#### A.3.1. Climat, paysage et ressources

Les paramètres **climatiques** ont un impact sur les populations d'insectes, qui est à la fois direct et indirect. Le changement climatique induit un bouleversement de divers paramètres, tels que la température et les précipitations, qui affectent directement l'activité et le comportement des abeilles (Le Conte & Navajas, 2008 ; Flores *et al.,* 2019 ; Soroye *et al.,* 2020). Celles-ci peuvent être soumises à des conditions extrêmes lors de périodes arides prolongées ou de précipitations inhabituellement élevées. Les abeilles sont également impactées lorsque leur environnement est altéré. Ainsi, une modification du paysage aura des conséquences sur la quantité ou la qualité des ressources accessibles (pollen, nectar) qui peuvent affecter considérablement les colonies (Le Conte & Navajas, 2008). Enfin, la modification du climat peut engendrer l'apparition d'espèces invasives potentiellement à risque pour les abeilles (Le Conte & Navajas, 2008 ; Hellmann *et al.,* 2008).

La transformation des **paysages** n'est pas uniquement du ressort du climat puisque ceux-ci ont continuellement été modifiés par l'Homme. De nombreuses zones de biodiversité ont disparu avec la déforestation et la diminution de zones de friches ou de bosquets, dues à une urbanisation croissante et à une généralisation de l'agriculture intensive. Les surfaces cultivables ont été optimisées par le remembrement des parcelles et une extension des monocultures pour répondre à une production plus compétitive et mondialisée (Dudley & Alexander, 2017). En conséquence, les abeilles doivent faire face à une diminution de la densité et de la diversité florales, notamment après la floraison des cultures (Holzschuh *et al.*, 2007), et donc à un appauvrissement de la **quantité et de la qualité des ressources** disponibles. Malheureusement, la restauration de paysages pour préserver ou reconstituer la diversité et l'abondance des pollinisateurs reste moins efficace que la conservation de l'environnement d'origine (Montoya-Pfeiffer *et al.*, 2018). Enfin, il a été récemment suggéré que la pollution électromagnétique aux très faibles fréquences générée par les installations électriques serait une source de confusion importante pour les abeilles (Shepherd *et al.*, 2019).

#### A.3.2. Risques biotiques : la pathosphère de l'abeille

L'abeille domestique est confrontée à de nombreux pathogènes et prédateurs. Ces facteurs de stress biotiques seront décrits brièvement dans ce chapitre (**Fig. 8**). Plusieurs émergences d'espèces invasives ont eu lieu ces dernières décennies, comme les parasites *Nosema ceranae* et *Varroa destructor*, et le prédateur *Vespa velutina*. Les facteurs contribuant à ces émergences sont fortement liés aux activités humaines (échanges internationaux de personnes ou de marchandises ; Brosi *et al.*, 2017), aux caractéristiques des agents infectieux (antibiorésistance, évolution des pathogènes et surtout celle, rapide, des virus à ARN), à l'environnement (réchauffement climatique, modifications des paysages) (Le Conte & Navajas, 2008). Ainsi, en installant des colonies dans des régions où l'abeille européenne était absente, celle-ci peut entrer en contact avec de nouveaux pathogènes. Les échanges d'abeilles ou de matériels et produits apicoles peuvent ensuite favoriser leur dissémination.

#### Reproduction and mating in the sealed brood cell adult male adult female protonymph deutonymph Mother mite with two daughter mites leaving the worker brood cell mating egg egg egg egg egg 1 2 3 4 5 ][ ][ ] [ ] [ 10 Invasion of brood prior to capping REPRODUCTIVE PHASE PHORETIC Spreading via desorientated and / or robbing bees

**Figure 9. Cycle de vie de Varroa.** Les Varroa femelles passent de la phase phorétique sur les abeilles adultes (en bas) à la phase reproductive au sein du couvain peu avant l'operculation des alvéoles (en haut à gauche). Une fois l'alvéole operculée, la femelle pond un premier œuf mâle (non fertilisé) après 3 jours environ, puis pond jusqu'à quatre œufs femelles les jours suivants. Leur développement passe par les stades de protonymphe et deutonymphe. Les femelles, matures après environ 6 jours, commenceront à être fécondées par le *Varroa* mâle 10 jours après l'operculation. Les femelles quitteront l'alvéole avec l'émergence de l'abeille. D'après Rosenkrankz *et al.* (2010).

#### A.3.2.1. Les parasites

#### • Les acariens ectoparasites dont Varroa destructor

Trois types d'acariens parasites de l'abeille sont actuellement connus :

- Acarapis woodi, agent étiologique de l'acariose des trachées chez A. mellifera et Apis cerana (Fig. 8g ; Sakamoto et al., 2017). Il vit dans les trachées respiratoires des trois castes d'abeilles et se nourrit de leur hémolymphe,
- Tropilaelaps clareae et Tropilaelaps mercedesae (de Guzmann et al., 2017), parasites du couvain d'A. mellifera,
- Varroa destructor, parasite d'A. mellifera et A. cerana (Fig. 8a,d ; Genersch, 2010). V. destructor est l'un des pathogènes les plus menaçants pour les colonies d'abeilles domestiques (Genersch et al., 2010 ; Le Conte et al., 2010).

L'hôte d'origine de *V. destructor* est l'abeille asiatique *Apis cerana*. Le parasite se serait adapté à *A. mellifera* en Asie du Sud-Est (Oldroyd, 1999) puis n'a cessé d'augmenter son aire de répartition à travers les échanges d'abeilles. En Europe, il est apparu dans les années 1970 (Potts *et al.*, 2015). Alors qu'il a peu d'effet sur la santé d'*A. cerana* du fait de leur coévolution, *V. destructor* affecte grandement le couvain et les adultes chez *A. mellifera*. *V. destructor*, parasite obligatoire de l'abeille, se nourrit de l'hémolymphe ou du corps gras de celle-ci (Ramsey *et al.*, 2019). Son cycle de développement est intimement lié à celui de son hôte (**Fig. 9**; Rosenkranz *et al.*, 2010). L'action spoliatrice de *V. destructor* induit un affaiblissement des abeilles émergentes, illustré par un poids réduit et une longévité plus courte (De Jong *et al.*, 1982). Des traitements acaricides existent pour pallier les importants dommages induits par *V. destructor*, dont les substances actives (s.a.) sont principalement l'amitraz (une formamidine), le coumaphos (un organophosphoré) et le tau-fluvalinate (un pyréthrinoïde). Celles-ci permettent de limiter les pertes de colonies mais aussi la transmission de virus dont *V. destructor* est vecteur (Genersch, 2010). Cependant, le danger que représente le parasite s'accroit puisque celui-ci semble acquérir une résistance à certains acaricides (Elzen *et al.*, 2000).

#### • Les endoparasites dont Nosema

L'abeille peut être infectée par quelques endoparasites parmi lesquels :

- Ascophaera apis, champignon ascomycète responsable de la maladie du couvain plâtré (Fig. 8f; Klinger et al., 2015),
- Crithidia mellificae et Lotmaria passim, des trypanosomes qui ont parfois été observés lors de surmortalités saisonnières, notamment en combinaison avec Nosema (Fig. 8b; Ravoet et al., 2013; Schwarz et al., 2015),
- Les microsporidies du genre Nosema (Fig. 10 ; Williams et al., 2014). Si Nosema apis est un parasite ayant co-évolué avec son hôte, il a été remplacé par Nosema ceranae qui aurait récemment émergé chez A. mellifera. N. ceranae a aujourd'hui une répartition mondiale.



**Figure 10. Les spores des Nosema de l'abeille.** Spores de Nosema ceranae (A), Nosema apis (B) et Nosema neumanni (C) au microscope électronique à transmission. D : diplokaryon, PF : tube polaire. Barre d'échelle : 0.5 μm. Le tableau en bas à droite présente les caractéristiques spécifiques des spores des trois espèces. Figure assemblée depuis Fries *et al.* (1996), Paxton (2010), Ptaszyńska *et al.* (2014) et Chemurot *et al.* (2017).

Son rôle dans les pertes de colonies est controversé mais elle semble être un facteur d'affaiblissement des colonies. Plusieurs études suggèrent un rôle dans certaines surmortalités dans le cas de co-expositions avec d'autres facteurs de stress (*cf.* C.5 ; Doublet *et al.,* 2015 ; Maes *et al.,* 2016 ; Retschnig *et al.,* 2017). Une troisième espèce, *Nosema neumanni*, phylogénétiquement proche de *N. apis*, a récemment été identifiée en Afrique de l'Est (Chemurot *et al.,* 2017).

#### A.3.2.2. Les bactéries pathogènes : les loques

La loque américaine et la loque européenne sont provoquées respectivement par les bactéries Firmicutes Gram positif *Paenibacillus larvae* et *Melissococus plutonius*. Les bactéries se développent dans l'intestin moyen des larves à la suite de leur ingestion (Forsgren, 2010 ; Morrissey *et al.*, 2015). La loque américaine est contagieuse et difficile à contrôler du fait que *P. larvae* est disséminé sous forme d'endospores résistantes. Elle induit de très fortes mortalités au sein du couvain, conduisant généralement à une perte de la colonie (**Fig. 8e**). La loque américaine est une menace majeure depuis les années 1970 (vanEngelsdorp & Meixner, 2010). C'est une maladie à déclaration obligatoire appartenant également à la liste de l'organisation mondiale de la santé animale, qui implique des mesures de police sanitaire comme la destruction par le feu des ruches d'un rucher atteint. L'impact de la loque européenne est variable mais elle peut causer des épidémies localisées (Budge *et al.,* 2014).

#### A.3.2.3. Les virus

Depuis la première description du Sacbrood virus (SBV), responsable du couvain sacciforme chez *A. mellifera* (White, 1913), les nouveaux outils de microscopie et de détection moléculaire (séquençage de nouvelle génération) ont permis la découverte de nombreux autres virus (**Tab. II** ; McMenamin & Flenniken, 2018). La majorité sont des virus à ARN simple brin positif (+ssRNA). Certains infectent également d'autres espèces d'abeilles (Zhang *et al.,* 2012). Les quelques autres virus à ARN (-ssARN et dsARN) et à ADN (ssADN et dsADN) n'ont été découverts que très récemment, en particulier parce qu'ils ne présentent pas de symptômes apparents chez l'abeille (Schoonvaere *et al.,* 2018).

Parmi les virus majeurs, associés à des pathologies et dont la répartition est mondiale, on compte (pour les acronymes, voir **Tab. II**) :

- L'IAPV, virus paralytique possiblement associé au CCD (Cox-Foster et al., 2007),
- Le CBPV, virus paralytique responsable de la maladie noire,
- \*L'ABPV, virus paralytique induisant des mortalités plus rapidement que le CBPV,
- Le SBV qui attaque le couvain et induit une décomposition des larves,
- Le BQCV qui attaque les cellules royales et aurait des effets combinés avec Nosema,
- Le DWV qui induit une déformation des ailes (Fig. 8d).

Genre	Virus	Type de génome	Vecteur / Mode de transmission	Synergie	Répartition				
Famille des Dicistroviridae									
Cripavirus	<b>BQCV</b> (Black Queen Cell Virus)	+ssRNA	Vertical, Horizontal	N. apis (+) N. ceranae (-)	Af, AmN, As, Eu				
<i>Aparavirus</i> (AKI complex)	<b>ABPV</b> (Acute Bee Paralysis Virus)	+ssRNA	<i>V. destructor,</i> Vertical		Am, As, Eu				
Aparavirus (AKI complex)	<b>KBV</b> (Kashmir Bee Virus)	+ssRNA	<i>V. destructor,</i> Vertical		AmN, As, Eu				
<i>Aparavirus</i> (AKI complex)	<b>IAPV</b> (Israeli Acute Paralysis Virus)	+ssRNA	V. destructor		Af, Am, As, Eu				
Famille des Iflaviridae									
lflavirus	<b>DWV</b> (Deformed Wing Virus)	+ssRNA	<i>V. destructor,</i> Sexuel, Vertical, Trophallaxie, Horizontal		Af, Am, As, Eu				
Iflavirus	<b>SBV</b> (SacBrood Virus)	+ssRNA	Vertical, Horizontal		AmN, As, Eu				
Iflavirus	<b>CSBV</b> (Chinese SacBrood Virus)	+ssRNA			As				
Iflavirus	KV (Kakugo Virus)	+ssRNA	V. destructor?		As				
Iflavirus	<b>S(B)PV</b> (Slow (Bee) Paralysis Virus)	+ssRNA	V. destructor						
Iflavirus	<b>VDV-1</b> (Varroa Destructor Virus 1)	+ssRNA	V. destructor		Af				
Famille des Tymov	<u>viridae</u>								
Maculavirus	<b>BeeMLV</b> (Bee Macula-Like Virus)	+ssRNA	V. destructor?	V. destructor?					
Famille des Iridoviridae									
Iridovirus	IIV-6 (Invertebrate Iridescent Virus 6)	dsDNA			AmN				
Famille inconnue									
Chroparavirus	<b>CBPV</b> (Chronic Bee Paralysis Virus)	+ssRNA	Vertical		AmN, As, Eu				
Sinaivirus	<b>LSV</b> (Lake Sinai Virus)	+ssRNA			Eu				
Genre inconnu	<b>FV</b> (Filamentous Virus)	dsDNA		N. apis	Eu				
Genre inconnu	<b>BVX</b> (Bee Virus X)	RNA		Malpighamo- eba mellificae	Eu				
Genre inconnu	<b>BVY</b> (Bee Virus Y)	RNA		N. apis	Eu				
Genre inconnu	<b>CWV</b> (Cloudy Wing Virus)	RNA		V. destructor?	Eu				

**Tableau II. Les virus de l'abeille.** La plupart sont des virus à ARN (+ssRNA désigne un ARN génomique positif à simple brin). Pour des références sur chaque virus, voir Esnault (2018).

Af : Afrique, Am : Amérique, AmN : Amérique du Nord, As : Asie, Eu : Europe.

Certains virus induisent des symptômes moins identifiables et d'autres sont asymptomatiques. Certains induisent des effets visibles à l'échelle de la colonie, provoquant une diminution de son activité et de ses performances et, pour les infections les plus graves, une mortalité significative.

Les virus sont transmis par voie horizontale (ingestion de ressources contaminées, trophallaxie ou *via* un vecteur comme *V. destructor*) ou verticale lorsque la reine est infectée (par ex. BQCV, CBPV, DWV ; Chen *et al.*, 2006 ; Tantillo *et al.*, 2015 ; Grozinger & Flenniken, 2019). Certains virus sont fortement associés au parasite *V. destructor* dont il serait vecteur, comme l'IAPV, ABPV et le KBV (appelé complexe AKI) ou le DWV (Yang & Cox-Foster, 2007 ; de Miranda *et al.*, 2010). Le DWV est ainsi plus fréquemment observé en présence de *V. destructor* chez qui il est même capable de se répliquer (Bowen-Walker *et al.*, 1999, Gisder *et al.*, 2009, Nazzi & Le Conte, 2016). Les contaminations inter-colonies se feraient par effet de dérive (abeilles pénétrant une autre ruche que la leur) et lors du butinage de fleurs contaminées par un précédent visiteur.

#### A.3.2.4. Les autres ravageurs et prédateurs

La **mouche parasitoïde** *Apocephalus borealis*, de la famille des Phoridae, n'a été observée qu'en Amérique du Nord (**Fig. 8h** ; Core *et al.*, 2012). Elle a été associée au CCD car elle induirait l'abandon de la colonie par les ouvrières infectées. Elle serait éventuellement porteuse du DWV et de *N. ceranae* (Core *et al.*, 2012).

Le **petit coléoptère des ruches** *Aethina tumida*, originaire d'Afrique sub-saharienne, est devenu invasif en Europe, aux États-Unis et en Australie où il a induit des ravages dans les colonies (Ellis & Hepburn, 2006 ; Neumann & Ellis, 2008). Le parasite se nourrit de pollen, de miel et de couvain. Il transmettrait la loque américaine et le SBV (Schäfer *et al.,* 2009, Eyer *et al.,* 2009).

La **fausse teigne** *Galleria mellonella* est un lépidoptère dont les larves se nourrissent de cire, de miel, de pollen et de couvain (Fig. 8c ; Kwadha *et al.,* 2017). Ce ravageur pose surtout des problèmes dans les stocks de cadres non occupés.

Le **frelon asiatique** *Vespa velutina* est un nouveau prédateur de l'abeille domestique, lui aussi originaire d'Asie. Accidentellement introduit en Europe depuis la Chine et reporté pour la première fois en France en 2004 (Villemant *et al.,* 2006), il se propage actuellement sur l'ensemble du continent Européen (Rortais *et al.,* 2010 ; Monceau *et al.,* 2014). Son statut de prédateur principal est fondé sur son attirance particulière pour les colonies d'abeille européenne, pillant les ruches, attaquant les ouvrières et dévorant les larves. *A. mellifera* est particulièrement démunie face à ce nouveau prédateur, n'ayant pas eu le temps de développer des moyens de défense comme *A. cerana* (Monceau *et al.,* 2014).



1 coumaphos 2 tau-fluvalinate 3 thymol 4 chlorothalonil 5 acetamiprid 6 amitraz 7 dithiopyr 8 thiacloprid 9 carbaryl 10 imidacloprid 11 pendimethalin 12 chlorpyrifos 13 phosmet 14 carbendazim 15 atrazine 16 thiamethoxam 17 chlorfenvinphos 18 fenpyroximate 19 clothianidin 20 endosulfan 21 thiophanate-methyl 22 metolachlor 23 fenpropathrin 24 methoxyfenozide 25 esfenvalerate 26 tebufenozide 27 captan 28 bifenthrin 29 azoxystrobin 30 lambda-cyhalothrin 31 diphenylamine 32 penconazole 33 trifloxystrobin 34 fenthion 35 norflurazon 36 metribuzin 37 hexachlorobenzene 38 alpha and beta HCH 39 phorate 40 gamma-HCH (lindane) 41 heptenofos 42 methiocarb 43 DDT 44 vinclozolin 45 methidathion 46 malathion 47 cypermethrin 48 dimethoate 49 carbofuran

**Figure 11. Les pesticides retrouvés dans les colonies d'abeilles.** Les quantités de pesticides sont exprimées en ng de molécule par g de pollen (en haut) et de nectar ou de miel (en bas). Les pesticides sont classés selon leur prévalence (fréquence) dans le pollen. Sanchez-Bayo & Goka (2014).

#### A.3.3. Risques abiotiques : les contaminants environnementaux

*A. mellifera* est un bioindicateur des contaminations de l'environnement (Celli & Maccagnani, 2003). L'abeille nous renseigne à la fois sur la toxicité des polluants, via les suivis de mortalité ou de marqueurs de stress, et sur leur répartition, à travers la détection de résidus dans les matrices de la ruche (Lambert *et al.,* 2012). Les xénobiotiques affectant l'abeille sont principalement associés à une pollution anthropogénique.

Les **pesticides** sont les contaminants les plus incriminés par les apiculteurs. Insecticides, acaricides, herbicides et fongicides sont des produits phytopharmaceutiques de familles très diverses, massivement utilisés en agriculture depuis les années 1950. Les herbicides et les fongicides sont, en termes de masse, les plus épandus. Les plantes génétiquement modifiées pour résister aux herbicides, notamment au glyphosate, ont notamment induit une augmentation des quantités épandues (Perry *et al.*, 2016). Les insecticides restent cependant les plus à risque pour l'abeille, qui représente une espèce non cible. Les pesticides peuvent contaminer les abeilles par exposition de contact, notamment lorsqu'ils sont pulvérisés dans les champs, ou par voie orale, *via* l'ingestion de ressources contaminées (pollen, nectar, eau) récoltées au cours du butinage. Les pesticides se retrouvent alors dans les **matrices de la ruche** : le pollen qui est récolté mais aussi le pain d'abeille, la cire, la propolis, le miel et les abeilles elles-mêmes (**Fig. 11**).

L'abeille est également un indicateur de pollutions aux **métaux lourds,** qu'elle bioaccumule (Rashed *et al.,* 2009). Certains métaux (cadmium, plomb) sont produits par les activités humaines (combustion, effluents miniers, pesticides, déchets industriels et urbains), d'autres (chrome, nickel) reflètent plutôt le milieu pédo-géochimique. Les activités urbaines et industrielles exposent aussi les abeilles aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Lambert *et al.,* 2012). Là encore, les abeilles sont exposées lors des activités de butinage sur des plantes accumulatrices, par la récolte d'eau contaminée ou par contact avec l'air pollué. On retrouve alors des métaux lourds et des HAP dans les matrices de la colonie (**Tab. III**).

Enfin, des substances sont directement introduites dans les ruches par les apiculteurs comme traitements contre les maladies (antibiotiques, acide oxalique). Les plus massivement utilisées sont les **acaricides** utilisés dans la lutte contre *V. destructor*. (**Fig. 11** ; Mullin *et al.,* 2010 ; Chauzat *et al.,* 2011 ; Lambert *et al.,* 2012).

## A.3.4. Influence du fond génétique de l'abeille

Plusieurs populations plus ou moins hybrides de sous-espèces d'abeilles (*cf.* A.1.2) sont élevées en apiculture. Cette diversité génétique joue un rôle important dans la résistance ou la sensibilité aux facteurs de stress, notamment aux pathogènes (**Fig. 12**; Potts *et al.,* 2010a). Si d'un côté l'élevage intensif d'individus hybrides comme l'abeille Buckfast réduit la diversité génétique de l'abeille domestique, différents programmes de conservations de génotypes locaux ont été récemment développés. Les populations locales, plus adaptées, présenteraient

Element	Units	Mean	SD	Range	
Cu	mg∕kg	1.99	4.31	0.05-17.30	
Zn	mg/kg	9.33	19.55	0.23-73.60	
As	mg/kg	0.05	0.04	ND-0.10	
Ni	mg/kg	1.24	2.62	ND-9.00	
Mn	mg∕kg	1.42	1.47	0.00-4.35	
Cd	$\mu$ g/kg	89.69	129.75	0.17-373.00	
Pb	$\mu$ g/kg	424.57	839.65	0.63-3232.00	
Со	$\mu$ g/kg	171.78	291.72	0.01-800.00	
Hg	$\mu$ g/kg	5.09	6.82	0.27-9.91	
Cr	$\mu$ g/kg	152.84	139.74	ND-370.00	
Ag	$\mu$ g/kg	299.61	419.17	3.21-596.00	

**Tableau III. Concentrations de métaux lourds dans le miel**. D'après Solayman *et al.* (2016).

ND, not detected; SD, standard deviation.



**Figure 12. Interactions entre les facteurs intervenant dans les pertes de colonies d'abeilles.** Les cadres bleus représentent les trois principaux groupes de facteurs associés aux pertes de colonies d'abeilles. Les flèches rouges vertes et bleues représentent respectivement les pressions directes exercées par les facteurs de stress, les interactions entre groupes, et les interactions intra-groupe. Potts *et al.* (2010).

en effet un taux de survie plus important que les populations allochtones (Meixner *et al.,* 2014). L'objectif est également de maintenir une diversité génétique permettant une adaptation des abeilles par sélection de variants résistants ou tolérants aux facteurs de stress.

Les apiculteurs ont donc un rôle important dans la préservation de la santé les abeilles *via* la conservation et la sélection de génotypes, le respect des règles sanitaires (visites sanitaires régulières, application de traitements adéquats, contrôle sanitaire lors des échanges de colonie) et la gestion des ressources des abeilles (emplacement des ruchers, qualité des compléments alimentaires, transhumance).



**Figure 13. Morphologie et développement des trois castes d'***A. mellifera*. **A.** Les trois castes. La reine est reconnaissable à son abdomen plus long. Les mâles, ou faux-bourdons, sont plus trapus avec des yeux globuleux. **B.** Développement des trois castes. La reine dépose un œuf au fond d'une cellule. Un œuf fécondé donnera une femelle diploïde, un œuf non fécondé un mâle haploïde. Après éclosion, la larve est nourrie de gelée royale puis de pollen par les nourrices qui operculent ensuite l'alvéole. Après métamorphose de la nymphe l'adulte émerge lui-même de la cellule. Le développement des mâles est plus long que celui des ouvrières. Celui des reines est plus court mais celle-ci est nourrie exclusivement de gelée royale dans une cellule spécialisée. D'après *Encyclopædia Britannica* (*www.britannica.com/animal/honeybee*)



butinage

10 15 20

5

25 âge (en jours)

0,5

0

0

**Figure 14. Le polyéthisme d'âge** : les activités de l'ouvrière adulte au court de son existence. L'échelle des ordonnées représente la fréquence d'occupation à la tâche (unité arbitraire). D'après Clément *et al.* (2012).

# **B.** LE SYSTÈME ABEILLE : DE L'HOLOBIONTE À LA SOCIÉTÉ

Ce court chapitre a pour objectif de fournir quelques informations sur l'abeille, incluant son cycle de vie, des données sur son tube digestif et son immunité, ainsi qu'une description de son microbiote intestinal qui sera évoqué par la suite. Ces éléments seront utiles pour la compréhension du manuscrit.

# B.1. Le cycle de vie de l'abeille et de la colonie

L'ordre des hyménoptères est celui qui regroupe le plus d'espèces sociales (socialité intermédiaire ou vraie). L'**eusocialité** ("société vraie") se définit par des adultes vivant en groupe, un soin coopératif aux jeunes (larves), c'est-à-dire à des couvées qui ne sont pas à soi, une division reproductrice et un recouvrement des générations (Wilson, 1971). *A. mellifera* est une espèce eusociale qui présente à la fois une division reproductrice (**polyéthisme de caste**) et une division du travail des ouvrières en fonction de leur âge (**polyéthisme d'âge**). Une colonie regroupe 10 000 à 80 000 individus (avec une importante fluctuation saisonnière) appartenant à trois castes qui se distinguent par leur morphologie et leur développement (**Fig. 13**). Les deux castes reproductrices sont représentées par la reine et les mâles, ou faux bourdons. La reine est la seule femelle de la colonie capable d'être fécondée, lors d'un unique vol nuptial, et de pondre pour assurer la descendance de la colonie. Les faux-bourdons sont quelques milliers dans la colonie en saison apicole, pour assurer la fécondation des futures reines, mais ils en sont chassés avant l'hivernage. La caste des ouvrières, stériles, se charge de toutes les autres activités nécessaires au maintien de la colonie.

Les ouvrières ont différentes activités au cours de leur vie (**Fig. 14**), s'accompagnant de modifications physiologiques. À leur émergence, les jeunes ouvrières restent à l'intérieur de la ruche et ont successivement un rôle de nettoyeuse et de nourrice des jeunes larves. Elles ont ensuite un rôle de manutention et de bâtisseuses, en acquérant notamment la capacité de produire de la cire, puis assurent un rôle de ventilation pour la thermorégulation. Au bout d'une vingtaine de jours, les ouvrières commencent une activité à l'extérieur de la ruche, avec d'abord un rôle de gardienne puis de butineuse jusqu'à leur fin de vie, estimée à 45 jours en saison apicole. Ce sont les butineuses qui ont la charge de récolter les ressources nécessaires à la colonie et qui participent à la pollinisation.

Les principales **ressources** énergétiques de la colonie sont le nectar et le pollen. Le nectar, mais aussi le miellat, riches en glucides, permettent de confectionner le miel qui est plutôt destiné au stockage pour l'hiver. Le pollen est une importante source de protéines, de lipides,



forgut midgut hindgut

**Figure 15. Anatomie de l'abeille.** Schémas représentant **A.** l'anatomie générale et **B.** le tube digestif de l'ouvrière. D'après Clément *et al.* (2012). **C.** photographie d'une dissection du tube digestif. D'après Engel *et al.* (2015).

de vitamines et d'oligo-éléments. D'autres ressources sont récoltées comme l'eau et les exsudats de plantes pour la confection de propolis.

C'est durant la saison estivale que la colonie se développe le plus et que son activité est la plus forte. C'est pendant cette période qu'a lieu la reproduction et que les ouvrières stockent la majorité des réserves. Pendant la saison hivernale l'activité est au ralenti (**hivernage**). Les ouvrières restent à l'intérieur de la ruche, se nourrissant sur les réserves, et forment une grappe qu'elles maintiennent à une température atteignant presque 35°C en son centre. Ces ouvrières, nées de la dernière ponte en automne, présentent des différences physiologiques leur offrant une durée de vie plus longue, de quatre à six mois contre un mois et demi environ en période apicole, ce qui leur permet de passer l'hiver (Winston, 1987).

# **B.2. L'intestin de l'abeille**

L'abeille est exposée aux pesticides par contact et par voie orale. Dans ce dernier cas, les contaminants sont absorbés lors de leur transit dans le tube digestif, essentiellement au niveau de l'intestin moyen. L'intestin moyen est en outre le site de développement du parasite *N. ceranae* dont les spores s'accumulent ensuite dans l'ampoule rectale (*cf.* C.3).

## B.2.1. L'appareil digestif de l'abeille

La **Fig. 15** montre l'anatomie interne de l'ouvrière et de son tube digestif. L'**appareil digestif** comprend (Douglas, 2012) :

- la bouche, où aboutissent les glandes salivaires et hypopharyngiennes,
- le pharynx, qui permet de pomper les aliments,
- l'œsophage, qui traverse le thorax et le pédoncule jusqu'à l'abdomen,
- le jabot où sont stockés les aliments qui peuvent être éventuellement régurgités (processus de trophallaxie qui intervient aussi dans la formation de miel),
  intestin antérieur
- le proventricule et sa valve contrôlant le passage dans l'intestin moyen,
- le ventricule, où sont absorbés les nutriments,
- l'iléon ou intestin grêle,
- l'ampoule rectale, ou rectum, qui se termine par l'anus.

De l'œsophage au proventricule, le tube digestif est appelé intestin antérieur. Chez l'abeille, l'intestin moyen est représenté par le ventricule, sans cæcum gastrique y débouchant comme chez certains autres insectes. Il y a donc synonymie entre ventricule et intestin moyen chez l'abeille. Entre le ventricule et l'iléon débouchent les tubes de Malpighi (appareil excréteur). De l'iléon à l'anus, on parle d'intestin postérieur. Comme chez tous les insectes, les intestins

intestin moyen

intestin postérieur



**Figure 16. Coupe de l'intestin moyen d'une abeille au microscope optique** à epifluorescence. Les cryptes sont bien visibles (C) ainsi que la matrice péritrophique détachée (MP). Le marquage sombre au BrdU montre la division des noyaux des cellules souches (N). La membrane basale semble visible (MB). D'après Forkpah *et al.* (2014).



**Figure 17. Coupes de l'intestin moyen** (Mid) **au microscope électronique à balayage.** De l'intérieur vers l'extérieur : L : lumen, Sb : bordure striée, Epth : épithélium, Bm : membrane basale, Cmscl : muscles circulaires, Lmscl : muscles longitudinaux. D'après Aljedani *et al.* (2017).

antérieurs et postérieur, d'origine ectodermique, sont recouverts d'un véritable exosquelette cuticulaire de chitine et de glycoprotéines (Douglas, 2012).

## B.2.2. L'intestin moyen de l'abeille

Le ventricule est la partie de l'intestin qui n'est pas recouverte de chitine. C'est le site principal de la digestion et de l'absorption des nutriments, mais aussi probablement des contaminants. En revanche, entre l'épithélium et le bol alimentaire se trouve la **matrice péritrophique**, constituée de protéines, de chitine et de protéoglycanes (Douglas, 2012 ; Teixeira *et al.,* 2019). Semi-perméable, la matrice péritrophique joue un rôle important dans l'absorption des nutriments et constitue une première défense contre les pathogènes et les xénobiotiques.

La matrice péritrophique délimite un espace ectopéritrophique entre elle et l'épithélium intestinal. Les cellules épithéliales forment des cryptes et sont constamment renouvelées par la division de cellules souches à la base de l'épithélium, qui vont ensuite migrer et se différencier (Fig. 16). Autour de l'épithélium se trouvent la membrane basale puis deux couches de muscles striés - il n'y a pas de muscles lisses chez les insectes -, les muscles circulaires puis les muscles longitudinaux qui courent tout le long du ventricule (Fig. 17).

# **B.3.** Le microbiote intestinal de l'ouvrière

L'abeille et ses communautés microbiennes symbiotiques constituent un **holobionte** (c'està-dire un supra-organisme comprenant l'animal et les microorganismes qu'il héberge ; Gordon *et al.*, 2013). La grande majorité des symbiontes de l'abeille est comprise dans son **microbiote intestinal**, qui n'est étudié que depuis peu. On lui attribue, comme chez d'autres espèces, un rôle essentiel dans le fonctionnement du système digestif, dans celui du système immunitaire et dans le développement de l'insecte (Guo *et al.*, 2015 ; Kwong & Moran, 2016 ; Kakumanu *et al.*, 2016).

## **B.3.1.** La composition et l'organisation du microbiote intestinal

Le microbiote d'*A. mellifera* est très abondant au niveau intestinal, et plus particulièrement au niveau de l'intestin postérieur. Sa composante cellulaire est essentiellement représentée par les bactéries, les communautés archéennes et eucaryotes semblant bien moins importantes. Des études récentes ont mis en lumière une communauté virale assez riche (Cox-Foster *et al.*, 2007 ; McMenamin & Flenniken, 2018).

L'abondance de la flore bactérienne intestinale, dont la détermination est fondée sur une quantification des copies d'ADNr 16S, est estimée entre 10<sup>8</sup> et 10<sup>9</sup> bactéries (Martinson *et al.,* 2012). Cette abondance semble représentée par une faible diversité de taxa bactériens, dont certains, caractéristiques de l'environnement intestinal, sont également retrouvés chez l'homme ou la drosophile (Ryu *et al.,* 2008). Le microbiote fondamental ou **microbiote "core"** 



**Figure 18. L'intestin de l'abeille et ses communautés bactériennes. A.** Composition globale du microbiote intestinal de l'ouvrière adulte, basée sur l'étude des ADNr 16S bactériens d'intestins entiers. 5 clades forment un microbiote 'core' représentant >95% des bactéries. **B.** Tube digestif de l'abeille, avec la bouche (mouth) et le jabot (crop) qui ne font pas partie de l'intestin, l'intestin moyen (midgut), et l'intestin postérieur (hindgut) composé de l'iléon (ileum) et de l'ampoule rectale. La répartition des grands groupes bactériens, basée sur des approches d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et de PCRQ, est indiquée. **C.** Evolution du microbiote au cours de la vie de l'ouvrière. Les adultes émergentes portent peu ou pas de bactéries et acquerraient principalement leur microbiote par contact avec les matières fécales. Le microbiote de l'adulte serait installé au bout de 4 à 6 jours. D'après Kwong & Moran (2016).

de l'abeille, présent chez tous les individus, comprend cinq espèces ou clusters d'espèces parfois mal définis (**Fig. 18A** ; Moran *et al.*, 2012 ; Crotti *et al.*, 2013 ; Kwong & Moran 2016) :

- + Lactobacillus Firm4, appartenant aux Firmicutes,
- \* Lactobacillus Firm5, appartenant aux Firmicutes,
- Bifidobacterium spp, appartenant aux Actinobatéries et phylogénétiquement associés à l'espèce Bifidobacterium asteroides,
- Gilliamella apicola, une Gammaprotéobactérie spécifique de l'abeille,
- \* Snodgrassella alvi, une Betaprotéobactérie également spécifique de l'abeille.

D'autres espèces sont généralement présentes :

- + Frischella perrara, une Gammaprotéobactérie,
- Trois clusters d'Alphaproteobactéries représentés par les genres Bartonella (cluster Alpha-1), Commensalibacter (Alpha-2.1), et Bombella (Alpha-2.2) (Bonilla-Rosso et al., 2019).

Ces neuf clades représentent à eux seuls entre 95% et 99,9% de la flore bactérienne intestinale (Kwong & Moran 2016). À une échelle plus fine, ce microbiote cacherait une diversité plus importante. Par exemple une grande diversité intraspécifique a été observée chez *G. apicola* et *F. perrara* (Kwong *et al.,* 2014).

Les espèces bactériennes se répartissent inégalement le long de l'intestin de l'ouvrière (**Fig. 18B**). L'intestin moyen et le jabot sont moins colonisés que l'intestin postérieur. Le jabot présenterait des espèces plutôt associées aux plantes et aux matrices de la ruche. Certaines de ces espèces peuvent d'ailleurs être cultivées en condition aérobie, comme *Lactobacillus kunkeei* (Martinson *et al.,* 2012 ; Anderson *et al.,* 2016). *G. apicola* serait prédominante dans l'intestin moyen. Les cinq bactéries du microbiote "core" sont très abondantes dans l'intestin postérieur, qui comprendrait >99% des bactéries intestinales. Au niveau de l'iléon, *S. alvi* formerait une couche sur les parois intestinales au-dessus de laquelle se formerait une couche de *G. apicola* (**Fig. 18B**). *F. perrara* est surtout localisée au niveau du pylore. Parmi les Alphaprotéobactéries, *Bombella* semble plus abondante dans le jabot et l'intestin moyen et *Commensalibacter* dans le rectum (Bonilla-Rosso *et al.,* 2019).

Les microbiotes des mâles et de la reine se distinguent de celui des ouvrières par des différences d'abondance et de composition et certains groupes majeurs peuvent manquer (Kapheim *et al.,* 2015 ; Tarpy *et al.,* 2015). Ces différences seraient liées à leur physiologie, leur activité et leur régime alimentaire.

#### B.3.2. L'acquisition et le développement du microbiote

L'holobionte se caractérise aussi par un développement parallèle du microbiote et de son hôte. Les bactéries du microbiote sont pour beaucoup anaérobies facultatives ou microaérophiles, donc peu adaptées au milieu externe, et les interactions entre individus dans le contexte cloisonné de la colonie seraient importantes pour leur transmission (Kwong & Moran, 2016).



**Figure 19. Activités métaboliques du microbiote core** modélisées à partir de données (méta)génomiques, et métatranscriptomiques et d'expérimentations sur souches cultivées. Les bactéries fermentatives dominent (*G. apicola, Bifidobacterium, Lactobacillus*). Certaines bactéries peuvent cliver les polysaccharides présents dans le pollen, comme la pectine et l'hémicellulose. Les sucres sont fermentés en différents produits (lactate, acétate) selon les espèces et les souches. Les capacités de synthèse *de novo* des bactéries fermentatives semblent limitées. Les produits de fermentation peuvent être absorbés par *S. alvi* comme source de carbone et d'énergie. L'abeille profiterait aussi des métabolites produits par les bactéries. D'après Kwong & Moran (2016).



**Figure 20. Protection contre les pathogènes par le microbiote intestinal.** HR : réponse humorale, CR : réponse cellulaire. D'après Hamdi *et al*. (2011).

Un premier développement du microbiote est observé dès le stade larvaire (**Fig. 18C**). Il serait principalement acquis *via* les transferts de nourriture opérés par les nourrices. Après operculation des alvéoles et lors du stade nymphal, le microbiote déclinerait et serait beaucoup moins abondant (Powell *et al.*, 2014). Après émergence de l'imago, l'abeille acquiert son microbiote *core*. Les modes de transmission seraient principalement la trophallaxie, le contact avec les matrices de la colonie et le contact avec les fèces (transmission féco-orale). Un microbiote stable serait ainsi installé après environ six jours.

Le développement du microbiote dépend beaucoup de l'environnement auquel l'insecte est exposé. Or, cet environnement évolue et s'élargit avec l'âge de l'abeille. Par conséquent des variations peuvent survenir avec le stade de développement de l'insecte mais aussi avec les conditions paysagères (ressources) ou climatiques (Jones *et al.,* 2018 ; Ellegaard & Engel, 2019). Ainsi chaque abeille porte une communauté phylotypique distincte (Moran *et al.,* 2012 ; Ellegaard & Engel, 2019).

## **B.3.3.** Les fonctions du microbiote

L'intestin est un écosystème dans lequel les microorganismes ont des relations étroites et mutualistes, entre eux et avec leur hôte. Le microbiote participe ainsi au fonctionnement de l'intestin et influencerait même la performance des colonies et la pollinisation (Kwong & Moran, 2016 ; Khan *et al.*, 2020).

Le microbiote intestinal participe au **système digestif** (Fig. 19). Les bactéries jouent un rôle dans la digestion par la sécrétion d'enzymes nécessaires à la dégradation de polymères complexes, comme les polysaccharides composant le pollen qui ne peuvent être directement assimilés par l'insecte, et dans la production de composés assimilables par l'abeille, notamment des produits de fermentations (Engel *et al.,* 2012). Certaines vitamines sont également synthétisées par le microbiote, apportant des nutriments essentiels à l'abeille.

Le microbiote participe aux **défenses de l'hôte (Fig. 20).** Il constitue une barrière biologique contre les pathogènes à travers l'exclusion compétitive des pathogènes par une colonisation efficace de l'épithélium, notamment par la formation de biofilm protecteur. Il a également un rôle de modulateur immunologique puisqu'il est capable de stimuler la réponse immunitaire de l'hôte (Crotti *et al.*, 2013). Le microbiote peut aussi jouer un rôle direct dans l'inhibition d'agents pathogènes par la production de composés antimicrobiens. Les bactéries lactiques (*Bifidobactérium, Lactobacillus*) présentent des propriétés antimicrobiennes et pourraient avoir un rôle probiotique contre les loques (Vásquez *et al.*, 2012; Yoshiyama *et al.*, 2013). Le microbiote pourrait également participer à la résistance aux insecticides. Si rien de tel n'est connu chez l'abeille, il existe des exemples de symbiontes chez d'autres insectes qui dégradent les insecticides (Kikuchi *et al.*, 2012; Daisley *et al.*, 2018) ou qui sont associés aux populations résistantes aux insecticides (Dada *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2013; 2018).



**Figure 21. Mécanismes de détoxication des xénobiotiques** chez l'abeille, avec des exemples d'enzymes associées. La figure peut être trompeuse car les enzymes dites de "phase I et de phase II" n'interviennent pas nécessairement dans cet ordre chronologique et ces deux "phases" sont en fait concomitantes. La "phase 0" est proposée par les auteurs comme une phase préliminaire d'élimination des composés toxiques présents dans la nourriture avant ingestion, et la "phase III" comme phase d'excrétion des composés produits. Berenbaum & Johnson (2015).

Enfin, le microbiote participe à la modulation du pH intestinal et peut promouvoir la croissance de bactéries protectrices.

Un microbiote stable et sain peut ainsi être synonyme de bonne santé pour l'abeille et la colonie. À l'inverse, l'observation de modifications dans sa composition et sa diversité pourrait révéler un stress. Un déséquilibre de l'écosystème bactérien, ou **dysbiose**, serait alors une source supplémentaire de perturbation avec un dérèglement de la digestion ou de sa fonction immunitaire permettant le développement d'organismes opportunistes.

# B.4. Les défenses de l'abeille : immunité et détoxication

L'abeille possède des mécanismes de défense répondant à l'agression par un pathogène ou un pesticide. Une première barrière physique est constituée par la cuticule chitineuse et, au niveau de l'intestin moyen, par la matrice péritrophique (*cf*. B.2).

## **B.4.1. La détoxication des xénobiotiques**

Les xénobiotiques comme les pesticides sont absorbés par contact ou au niveau intestinal, alors essentiellement au niveau de l'intestin moyen, et peuvent diffuser dans l'insecte. L'abeille dispose de capacités détoxifiantes pour métaboliser les xénobiotiques. Par exemple, suite à une exposition orale à l'imidaclopride, une métabolisation de l'insecticide a été montrée, avec des variations dans les métabolites produits selon les organes (Suchail *et al.,* 2004a ; 2004b). Le processus de détoxication se divise en deux phases (**Fig. 21**) : une phase de modification (fonctionnalisation et conjugaison) et une phase d'excrétion (Berenbaum & Johnson, 2015).

Plusieurs enzymes, dites de "phase I", modifient les molécules xénobiotiques par oxydoréduction ou hydrolyse afin d'altérer leur activité. Ces enzymes sont des oxydases, avec surtout les **mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP)**, des réductases, et des hydrolases comme les carboxylestérases (Claudianos *et al.,* 2006 ; Berenbaum & Johnson, 2015). Chez l'abeille il a été montré que ces enzymes participent à la détoxication de plusieurs familles d'insecticides, notamment les néonicotinoïdes (Iwasa *et al.,* 2004), les organophosphorés (Johnson *et al.,* 2013), les phénylpyrazoles et les pyréthrinoïdes (Carvalho *et al.,* 2013). La surexpression de gènes codant des CYP est une réponse classique des insectes soumis aux insecticides chez les souches d'insectes résistantes (Gong & Diao, 2017).

Les insectes possèdent 4 clades de CYP : CYP2 (8 gènes chez l'abeille), CYP3 (28 gènes), CYP4 (4 gènes) et les CYP mitochondriaux (6 gènes). Les clades CYP3 (avec les familles CYP6 et CYP9) et CYP4 sont les plus importants pour la métabolisation des xénobiotiques. Les CYP diffèrent dans leur niveau d'expression selon les organes et dans leur sélectivité pour différents xénobiotiques. L'abeille possède peu de ces gènes par rapport aux autres insectes, avec 46 CYP identifiés dans son génome contre 85 chez la Drosophile (Feyereisen, 2006 ; Claudianos



Figure 22. Voies de signalisation de l'immunité humorale de l'abeille. Le génome de l'abeille code les membres majeurs des voies immunitaires des insectes. La première étape est la reconnaissance de motifs protéiques associés au pathogène (PAMP) : ARN viral, peptidoglycane bactérien, glucanes fongiques. En général la voie Toll est impliquée dans la défense contre les Gram+ et les champignons et la voie Imd contre les Gram-, mais chaque interaction hôte-pathogène est unique. La voie Jak/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) est activée par la fixation d'un ligand (non identifié) au récepteur Domeless. Les kinases Jak sont alors phosphorylées, puis les régulateurs STATS sont à leur tour phosphorylés et dimérisés. Ils régulent l'expression des effecteurs antimicrobiens TEP (Thioester- containing proteins) et de l'inhibiteur SOCS de la voie Jak/STAT. La voie RNAi (RNA interference) est initiée par le clivage d'ARN double brin viral par Dicer-2 en petits siRNA qui sont chargés sur AGO2/RISC (RNA Induced Silencing Complex). Un brin du siRNA est utilisé pour cibler le génome viral et induire son clivage. Dicer-2 induit aussi une cascade de signalisation induisant l'expression de Vago et l'inhibition de la réplication virale. La voie Toll est activée par des récepteurs liant des PAMP bactériens (Gram+) et fongiques. Une cascade de protases à sérine conduit au clivage de pro- Spaetzle en Spaetzle active. La dimérisation de Toll recrute dMyD88, Tube, and Pelle. Pelle est impliquée dans la dégradation des inhibiteurs Cactus de NF-kB, induisant une libération des facteurs de transcription de type Dorsal (NFkB). Ceux-ci induisent l'expression de peptides antimicrobiens. La voie Imd (Immune deficiency) est activée par la fixation du peptidoglycane (PGN) des Gram- sur le récepteur PGRP-LC). Cela induit l'activation de l'adaptateur Ind, la phosphorylation de Relish par le complexe IKK, et le clivage de la caspase Dredd. Relish régule l'expression de gènes codant entre autres des peptides antimicrobiens. La voie JNK est indirectement activée par les protéines TAB et TAK, induisant, entre autres, l'expression de peptides antimicrobiens. D'après Brutscher et al. (2015).

*et al.,* 2006., BerenBaum & Johnson, 2015). Certains auteurs suggèrent que cette réduction du nombre de gènes serait une conséquence de l'eusocialité (Claudianos *et al.,* 2006). Certaines CYP participent aussi à métabolisation de nutriments et sont surexprimées suite à l'ingestion de miel ou de pollen (Johnson *et al.,* 2012; Mao *et al.,* 2011). Des paramètres environnementaux comme la nutrition pourraient donc moduler la métabolisation des xénobiotiques. Les métabolites produits lors de cette première phase de biotransformation ont une toxicité variable, parfois même plus importante que la molécule initiale.

La molécule xénobiotique peut en outre être conjuguée, par les enzymes dites de "phase II", à des composés comme le glutathion, qui remplace le caractère lipophile de la molécule par un caractère hydrophile permettant sa solubilisation et son transport (Berenbaum & Johnson, 2015). Les principales enzymes intervenant dans la conjugaison sont des transférases telles que la glutathion-S-transférase (GST), les sulfotransférases, les aminotransférases, les glucosyltransférases (Xu *et al.,* 2013). Les gènes codant ces enzymes seraient également moins représentés chez l'abeille (BerenBaum & Johnson, 2015).

L'excrétion des produits formés fait intervenir différents systèmes d'export, principalement des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) comprenant diverses sous-familles mal connues chez les arthropodes, comme les P-glycoproteins et autres protéines associées à la résistance multidrogue (multidrug resistance-associated proteins) (Dermauw & Van Leeuwen, 2014).

## B.4.2. L'immunité individuelle : réponse humorale et réponse cellulaire

Le système immunitaire des insectes est réduit à une réponse immunitaire innée reposant sur deux mécanismes : la réponse immunitaire humorale et la réponse immunitaire cellulaire. Ces mécanismes ont principalement été décrits chez la drosophile. Le nombre important de gènes de l'immunité retrouvés chez *A. mellifera* suggère une homologie de la réponse immunitaire chez l'abeille (Evans *et al.,* 2006).

Deux voies indépendantes interviennent dans la **réponse humorale** des insectes, la voie Toll et la voie Imd (**Fig. 22**). Elles régulent les facteurs de transcriptions NF-κB *via* différents peptides, contrôlant ainsi l'expression de gènes d'immunité (Ferrandon *et al.*, 2007). La voie Toll passe par des récepteurs transmembranaires activés par des cytokines générées par divers facteurs : facteurs pro-apoptotiques, espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species), lipopolysaccharide bactérien, ADN viral. Cette voie intervient principalement lors d'infections par des champignons ou des bactéries à Gram positif. La voie Imd, quant à elle, dépend de récepteurs de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP) et répond plutôt aux infections par des bactéries à Gram négatif (Paro *et al.*, 2016).

L'activation de l'expression des gènes de l'immunité par ces voies induit une réponse systémique par la sécrétion massive de **peptides antimicrobiens** (AMP, Antimicrobial Peptide) dans l'hémolymphe. Les AMP et les ROS, qui ont une capacité antibiotique mais aussi

cytotoxiques, peuvent également être produits localement, notamment au niveau de l'intestin (Broderick *et al.*, 2009).

La **réponse cellulaire** des insectes est médiée par les hémocytes. On distingue plusieurs types d'hémocytes résultant de la différenciation des pro-hémocytes. Les plus représentés sont les plasmatocytes, qui, à l'instar des macrophages, sont impliqués dans la phagocytose des débris cellulaires, des pathogènes, des cellules mortes ou en état d'apoptose (notamment à la suite d'une infection intracellulaire). Les plasmatocytes peuvent également produire des AMP en réponse à certaines infections (Paro & Imler, 2016). La différenciation des hémocytes en lamellocytes permet l'encapsulation et la neutralisation de corps étrangers plus larges ne pouvant être phagocytés, tels que certains parasites eucaryotes. Le mode d'action de ces cellules immunitaires est fortement lié à la réaction de mélanisation. La production de mélanine résulte d'une polymérisation de quinones issues de l'oxydation de phénols par des phénoloxydases. Ce mécanisme de mélanisation permet l'isolement de l'agent pathogène puis sa destruction notamment *via* les ROS et les AMP.

## B.4.3. L'immunité comportementale collective

L'abeille, en tant qu'insecte eusocial, montre des adaptations comportementales de protection contre les pathogènes, constituant une immunité collective (Evans & Spivak, 2010) :

- Auto- et allo-épouillage,
- Comportement hygiénique : détection et élimination du couvain infecté,
- Comportement nécrophorique : élimination du cadavre d'une congénère,
- Fièvre comportementale : contrôle de la température du nid,
- Isolement et prévention des sources de contamination : encapsulation par la propolis, sécrétion d'AMP et d'enzymes antiseptiques,
- Immunité organisationnelle : polyéthisme d'âge (les butineuses, qui sont les plus exposées lors de leurs sorties, sont aussi les plus âgées), contrôle du partenaire de trophallaxie (par ex. les butineuses ne sont pas nourrices),
- Retour à la colonie : contrôle des entrées par les gardiennes qui peuvent exclure des individus ; abandon volontaire et altruiste de la colonie par les abeilles malades (Rueppell et al., 2010).



Figure 23. Position et classification phylogénétiques des microsporidies. A. Dendogramme illustrant les hypothèses évolutives sur l'origine des microsporidies, positionnées comme groupe frère des fungi (1), à la base des fungi (2), au sein des Zygomycètes (3) ou comme groupe frère des Dikaria (4). Dans les phylogénies moléculaires, elles présentent une longue extension, en terme de distance génétique, par rapport à leur point d'insertion. Construit d'après Corradi & Keeling (2009). B. Arbre phylogénomique basé sur 43 orthologues uniques communs à 28 espèces de microsporidies. A droite figurent les hôtes correspondant. Wadi & Reinke (2020)

# **C.** *NOSEMA CERANAE*, UN PATHOGÈNE ÉMERGENT DE L'ABEILLE

# **C.1. Les microsporidies**

#### C.1.1. Des microchampignons parasites des animaux

Les microsporidies sont des organismes **eucaryotes unicellulaires apparentés aux champignons**, dont la position phylogénétique est encore discutée (Corradi & Keeling, 2009 ; Vávra & Lukeš, 2013 ; Han & Weiss, 2017 ; Wadi & Reinke, 2020). Ces organismes furent dans un premier temps considérés comme des protozoaires primitifs sans mitochondrie, mais les analyses moléculaires les rattachent à une branche au sein des *fungi* ou, le plus souvent, comme groupe frère des *fungi* (**Fig. 23**).

Les microsporidies sont des **parasites intracellulaires obligatoires** ayant un large spectre d'hôtes et pouvant être responsables de pathologies chez certains d'entre eux. Ils infectent toutes sortes de vertébrés et d'invertébrés mais également certains protistes. La diversité d'espèces susceptibles d'être infectées et la forte prévalence des microsporidies ont amené à considérer ces dernières comme ubiquistes (Vávra & Lukeš, 2013 ; Weiss & Becnel, 2014).

On dénombre de nos jours plus de 1500 espèces, regroupées en environ 200 genres, qui ne représenteraient cependant qu'une petite partie de leur diversité réelle (Keeling & Slamovits, 2004 ; Corradi, 2015). Les microsporidies les plus étudiées sont celles d'intérêt économique ou sanitaire, affectant les élevages animaux ou l'Homme. La première espèce décrite, *Nosema bombycis*, ravagea en France l'industrie du ver à soie *Bombyx mori* (Pasteur, 1870). Identifiée en 1857, elle fut alors classée comme un champignon de groupe incertain. Le phylum Microspora fût créé en 1882 et appelé par la suite Microsporidia (Balbiani, 1882). En aquaculture, des pertes sont induites par des espèces pathogènes de crustacés ou de poissons, notamment *Loma salmonae* chez le saumon (Kent *et al.,* 1989) et *Thelohania contejeani* chez les écrevisses (Overstreet, 1973). Ces infections sont d'autant plus importantes dans des conditions d'élevages intensifs (Keeling, 2009). En apiculture, trois espèces ont été décrites chez les abeilles domestiques (*cf.* A.3.2.1).

Chez l'homme on répertorie une dizaine d'espèces, parmi lesquelles *Encephalitozoon cuniculi* et *Enterocytozoon intestinalis*, qui peuvent être à l'origine de troubles intestinaux, hépatiques ou urinaires (Vivarès, 1999 ; Vávra & Lukeš, 2013). Des infections graves ont été observées chez des patients immunodéprimés (Weber *et al.*, 1994), révélant le caractère **opportuniste** des microsporidies (Didier & Weiss, 2008 ; Vávra & Lukeš, 2013). Cet opportunisme, couplé à une gamme d'hôte potentiellement large, amène le parasite à se développer chez des hôtes

**Tableau IV. Caractéristiques de génomes microsporidiens**. Pour comparaison sont montrées les données d'un autre microchampignon (la levure *S. pombe*), d'une moyenne calculée sur 131 génomes eumycètes, et d'un autre parasite intracellualire (le chromalvéolé *P. falciparum*).

	Encephalitozon intestinalis	Encephalitozon cuniculi	Nosema ceranae	Trachipleisto- phora hominis	Octosporea bayeri	Saccharomyces pombe	<i>Fungi</i> (moyenne)	Plasmodium falciparum
Taille du génome (Mpb)	2,3	2,9	5,7	8,5	≤24,4	12,6	38,2	22,8
Nombre d'ORF	1833	1999	2614	3266	2174	5118	11779	5268
Densité génétique (gene/kbp)	0,86	0,84	0,6	0,83	0,23	0,55	0,31	0,23
Distance intergénique moyenne (pb)	115	119	394	1180	429	227	nd	1694
Nombre d'introns	14	14	6	≤78	≥6	5362	32768	7406

Compilé de Corradi & Slamovits (2010), Heinz et al., (2012), PomBase (www.pombase.org) et Lozada-Chávez et al. (doi:10.1101/283549). D'après Pelin et al. (2015) pour N. ceranae. nd : non déterminé.



Génome dérivé

**Figure 24. Processus expliquant la compaction du génome microsporidien**. Ils ne se sont pas nécessairement déroulés dans l'ordre mentionné ni même séquentiellement. A. Une région génomique ancestrale hypothétique portant 7 gènes (flèches) a subi une perte de gènes (zones oranges) non nécessaires au parasite, réduisant son protéome. B. La réduction de la taille des régions intergéniques a augmenté la densité de gènes chez de nombreuses espèces. C. la réduction de la taille des gènes a poursuivi la réduction de la taille du génome. D'après Corradi & Slamovits (2010).



**Figure 25.** Proportion de séquences codantes, non codantes et répétées (respectivement en rouge, bleu et hachuré) dans les génomes des microsporidies *Trachipleistophora hominis, N. ceranae, E. cuniculi* et *E. intestinalis*. Le génome de *Saccharomyces* cerevisiae est illustré pour comparaison. Heinz et al. (2012).

inhabituels, ce qui peut favoriser son apparition chez de nouvelles espèces. On estime ainsi que la plupart des microsporidies infectant l'homme auraient été acquises depuis des espèces pouvant même être phylogénétiquement éloignées (Vávra & Lukeš, 2013).

#### C.1.2. Des parasites au génome et aux capacités métaboliques réduits

Une particularité des microsporidies tient aux caractères biologiques et génétiques spécifiques à ce phylum. Les premiers observés furent l'absence d'organites fondamentaux chez les eucaryotes, tels que les mitochondries ou les peroxysomes, qui en font des organismes considérés comme peu complexes (Williams *et al.,* 2002).

Leur simplicité est également incarnée par leur **génome compact**, dont la taille peut être très réduite, allant de 2,3 Mb chez *E. intestinalis* à 24 Mb chez *Octosporea bayeri* (**Tab. IV** ; Williams *et al.*, 2008 ; Corradi & Slamovits, 2010), celle de *N. ceranae* étant de 5,7 Mb (Pelin *et al.*, 2015). *E. intestinalis* possède le plus petit génome eucaryote connu à ce jour, avec une taille inférieure à celles de nombreux génomes bactériens (Corradi *et al.*, 2010). Cette compression du génome serait liée *i*) à la délétion de nombreux gènes non essentiels à la survie intracellulaire devenue fortement dépendante de l'hôte ; *ii*) à une optimisation de la taille des gènes, qui comportent en outre peu d'introns et qui montrent parfois des chevauchements, et *iii*) à la réduction des régions non codantes comme les séquences répétées et les régions intergéniques (**Tab. IV et Fig. 24** ; Keeling, 2009 ; Lee *et al.*, 2010 ; Corradi *et al.*, 2010). La variation de la taille du génome au sein des microsporidies serait moins liée au nombre de gènes qu'à la quantité de séquences non codantes et d'éléments transposables (**Fig. 25** ; Heinz *et al.*, 2012 ; Peyretaillade *et al.*, 2012).

L'analyse de ces génomes a permis d'apporter des réponses quant au métabolisme des microsporidies. Si ces organismes **ne possèdent pas de mitochondries**, on y retrouve des reliques, les **mitosomes**. Ceux-ci ne contiennent ni génome, ni protéines associées au cycle de Krebs ou à la chaine respiratoire, et la plupart des gènes mitochondriaux sont absents du génome nucléaire. Le mitosome conserve cependant des protéines associées à l'assemblage des complexes Fer-Soufre (Vávra & Lukeš, 2013).

Des voies métaboliques considérées comme essentielles chez la plupart des eucaryotes sont absentes chez les microsporidies, comme certaines impliquées dans la synthèse d'acides aminés, des nucléotides, des acides gras (Keeling, 2009 ; Corradi & Slamovits, 2010). Le métabolisme énergétique chez la microsporidie serait quant à lui très réduit et se limiterait à aux voies du tréhalose, des pentoses phosphates et à la glycolyse (Keeling & Corradi, 2011). Ces délétions de gènes seraient compensées par une capacité à utiliser les métabolites de l'hôte. Le génome réduit des microsporidies serait alors le résultat d'une évolution intracellulaire des parasites tendant vers une dépendance extrême envers leur hôte.





Figure 26. Distribution de N. ceranae dans différentes espèces hôtes. Le parasite a initialement été décrit en 1996 chez A. cerana en Chine. Puis il a été observé chez A. mellifera en Europe puis partout dans le monde (Afrique, Amériques, Océanie, Asie). Dans son aire de répartition asiatique, il infecte d'autres espèces du genre Apis mais A. cerana semble être l'hôte par lequel s'est fait le contact avec A. mellifera. N. ceranae est donc considérée comme un parasite émergent récemment installé chez indiquant un large spectre d'hôtes. Il est à noter que les régions en blanc peuvent dénoter une 'abeille européenne. Il a depuis été observé dans d'autres espèces d'abeilles et de bourdons, absence de données plutôt qu'une absence du parasite. Goulson *et al.* (2015).

# C.2. N. ceranae, un parasite émergent de l'abeille

## C.2.1. Un saut d'espèce de l'abeille asiatique vers l'abeille européenne

Les parasites microsporidiens responsables de nosémoses chez *A. mellifera* sont *N. apis* et *N. ceranae*. Si *N. apis* est présent depuis longtemps chez l'abeille européenne (Zander, 1909), l'**émergence** de *N. ceranae* chez *A. mellifera* est récente. Les premières études rapportant des infections par *N. ceranae*, simultanément à Taïwan et en Espagne, datent de 2005 (Higes *et al.,* 2006 ; Huang *et al.,* 2007). Par la suite, l'analyse d'échantillons d'abeilles plus anciens ont permis de retrouver des cas antérieurs d'infection dans différentes régions du monde jusqu'aux années 70 (Chen *et al.,* 2008 ; Invernizzi *et al.,* 2009 ; Teixeira *et al.,* 2013 ; Traver & Fell, 2015).

*N. ceranae* a été décrit pour la première fois en 1996 chez l'abeille asiatique, *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996). La majorité des études explique l'apparition de *N. ceranae* chez l'abeille européenne par un **saut d'espèce** effectué il y a seulement quelques décennies depuis *A. cerana* (Chaimanee *et al.*, 2011). La promiscuité entre ces deux espèces serait en cause en raison de l'implantation de colonies d'*A. mellifera* en Asie (Higes *et al.*, 2010). *N. ceranae* infecte d'autres espèces d'abeilles à miel (genre *Apis*) et de bourdons (genre *Bombus*) mais il pourrait s'agir de clades distincts au sein de l'espèce *N. ceranae* (**Fig. 26**; Li *et al.*, 2011; Chaimanee *et al.*, 2011; Graystock *et al.*, 2013).

## C.2.2. N. ceranae est devenu la microsporidie majoritaire chez A. mellifera

L'omniprésence et l'exploitation croissante de l'abeille européenne dans l'ensemble des régions du monde, ainsi que la multiplication des échanges commerciaux de colonies, ont favorisé à la fois l'essor et la transmission du pathogène. De plus le développement de *N. ceranae* semble plus important chez *A. mellifera* que chez *A. cerana* (Sinpoo *et al.,* 2017). Aujourd'hui, la distribution de *N. ceranae* est devenue globale et sa prévalence est devenue très importante (**Fig. 26** ; Klee *et al.,* 2007). La présence initiale de *N. apis* dans les ruchers n'empêche pas le développement de *N. ceranae* et de nombreux cas de coinfections ont été observés. *N. ceranae* semble même avoir supplanté *N. apis* dans de nombreuses régions, du fait de son développement rapide et du taux d'infestation des colonies plus important.

## C.2.3. Influence du climat et saisonnalité de l'infection

Le remplacement de *N. apis* par *N. ceranae* serait surtout observé dans des environnements plus favorables au pathogène émergent, tels que des climats chauds et humides (Lotfi *et al.,* 2009 ; Fries *et al.,* 2010 ; Stevanovic *et al.,* 2011 ; Martinez *et al.,* 2012 ; Botias *et al.,* 2012 ; Martín-Hernández *et al.,* 2012 ; Higes *et al.,* 2013). La sensibilité des spores de *N. ceranae* aux faibles températures pourrait à l'inverse limiter ce phénomène dans des régions plus froides, comme en Suède où *N. apis,* moins sensible aux faibles températures, reste prédominante (Fenoy *et al.,* 2009 ; Forsgren & Fries, 2013 ; Blažytė-Čereškienė *et al.,* 2016).


**Figure 27. Structure d'une spore de microsporidie**. Schéma représentant la strucure et les différents organites caractéristiques des spores de microsporidies avec une paroi composée de trois couches l'exospore, l'endospore (en violet) et la membrane plasmique (en rose) ; le tube polaire (en jaune) attaché au niveau du disque d'ancrage ; le polaroplaste lamellaire dans la partie antérieure ; le polaroplaste tubulaire (en rose) ; le noyau et la vacuoles postérieure (en bleu). D'après Franzen (2005).

Le pourcentage de colonies porteuses de *N. ceranae* est très variable. Nul dans certaines régions d'Afrique (Strauss *et al.,* 2013 ; Llorens-Picher *et al.,* 2017), il varie de quelques pourcents à plus de 60% en zones continentales (Cavigli *et al.,* 2016 ; Porrini *et al.,* 2016), atteignant presque 100% dans les milieux tropicaux insulaires (Martin *et al.,* 2013 ; Rangel *et al.,* 2018).

La saison semble avoir un impact important dans le développement de *N. ceranae*. Dans les régions tempérées, des pics d'infestation sont observés au printemps (Gisder *et al.*, 2010 ; Runckel *et al.*, 2011 ; Traver *et al.*, 2012). Ces hausses ne sont cependant pas systématiques (Martín-Hernández *et al.*, 2007 ; D'Avsise *et al.*, 2019) et ne semblent pas être uniquement corrélées à la température, d'autres paramètres saisonniers pouvant intervenir. Des paramètres comportementaux peuvent notamment avoir une influence sur la dispersion du pathogène ou le taux d'infection au sein de la colonie. Ce taux pourrait être beaucoup plus important en hiver à cause du non-renouvellement des ouvrières, tandis que la faible activité à l'extérieur de la ruche limiterait la dispersion du parasite (Adjlane & Doumandji, 2012). À l'inverse, à l'approche de l'été, le taux d'infection au sein des colonies parasitées diminuerait alors que la prévalence du parasite sur l'ensemble des colonies augmenterait. En revanche une absence de saisonnalité a été observée dans des conditions tropicales et subtropicales (Fries, 2010).

# C.3. Le cycle de vie de N. ceranae

## C.3.1. La spore : forme de résistance et de dissémination

Dans l'environnement, les microsporidies se trouvent sous forme de spores ovales et de tailles variables selon les espèces, allant de 1  $\mu$ m à plusieurs dizaines de  $\mu$ m (Keeling & Fast, 2002 ; Chen *et al.*, 2009 ; Sharma *et al.*, 2014). Les spores de *N. ceranae* sont plutôt petites (4,4 x 2,2  $\mu$ m), permettant de les différencier de celles de *N. apis* légèrement plus grandes (**Fig. 10** ; Fries *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2009 ; Ptaszynska *et al.*, 2014). Si la taille des spores varie selon les espèces, leur structure, elle, est caractéristique du phylum. Elle leur offre une **résistance** particulièrement élevée aux changements environnementaux (dessiccation, température, *etc.*). Les spores de *N. ceranae* et *N. apis* résistent à de fortes températures, jusqu'à 60°C, et à la réfrigération (Fenoy *et al.*, 2009 ; Fries *et al.*, 2010 ; Özgör & Keskin, 2017), même si leur pouvoir infectieux diminue plus vite à très basse température (McGowan *et al.*, 2016).

Cette robustesse est due à la structure de la spore dont la membrane plasmique est entourée d'une double paroi extracellulaire rigide qui lui confère une résistance élevée à la pression osmotique (**Fig. 27**). La paroi externe (exospore) est formée d'une matrice glycoprotéique épaisse et dense alors que la paroi interne (endospore) est plus fine et composée, entre autres, de chitine. La spore renferme le sporoplasme dans lequel se trouve l'ensemble des organites et du matériel infectieux (Fries *et al.,* 1996). Il se compose du noyau, qui est double (diplocaryon) chez *N. ceranae* et *N. apis*, d'une vacuole dans sa partie postérieure, d'un



**Figure 28. Cycle de vie de** *N. ceranae*. **A.** Image d'une spore dévaginée (ici *E. hellem*) au microscope électronique superposée à une image en microscopie à épi-fluorescence avec marquage des protéines du tube polaire PTP1 (en rouge) et PTP4 (en vert). PT : tube polaire, SP : sporoplasme. Barre :  $2 \mu m$  à gauche,  $1 \mu m$  à droite. Han *et al.* (2017). **B.** Le cycle de vie de *N. ceranae* est le même que celui de *N. apis,* représenté ici. Après ingestion de spores binucléées (*N*) à paroi épaisse (*CW*) **1**, le tube polaire (*TU*) est extrudé pour permettre le transfert du sporoplasme infectieux (*SP*) vers le cytoplasme de la cellule hôte (*HC*) **2 3**. Les parasites se multiplient alors sous forme de mérontes (mérogonie) **4 • 9**, puis se différencient en sporontes (*EN* : enkystement) qui subissent une nouvelle division (sporogonie) **10 11** et forment des spores matures **12** infectant les cellules adjacentes ou libérées dans la lumière intestinale par lyse cellulaire **13**. *NH* : noyau de la cellule hôte. (D'après Mehlhorn, 2008) **C.** Observation au MET de mérontes de *N. ceranae* dans une cellule épithéliale d'abeille, entourés de mitochondries de l'hôte d'où ils puisent de l'énergie. Higes *et al.* (2007).

polaroplaste dans sa partie antérieure, constitué de plusieurs couches membranaires qui entourent un élément majeur de l'infection : le **tube polaire**. Le tube polaire, composé de couches glycoprotéiques, est fixé à l'apex de la spore *via* un disque d'ancrage. Il est enroulé et peut mesurer plus de 100 µm. Il est bien plus long que la spore elle-même à l'intérieur de laquelle il forme des enroulements. Le tube polaire est le mécanisme d'invasion caracté-ristique des microsporidies. Sa morphologie (nombre d'enroulements, taille, forme) constitue un caractère taxonomique discriminant les espèces microsporidiennes (Fries *et al.,* 1996).

#### C.3.2. Les modes de transmission

*N. ceranae* a initialement été observée chez les ouvrières adultes (Higes *et al.,* 2006 ; Huang *et al.,* 2007), les plus nombreuses dans la colonie et présentes durant toute la période hivernale. Cependant toutes les castes peuvent être infectées.

Le principal mode de transmission du pathogène dans la colonie est de type **féco-oral**, c'està-dire une contamination par ingestion après un contact avec des fèces contaminées. Les ouvrières adultes seraient plus exposées à ce type de contamination que les autres castes du fait de leur activité de manutention et de nettoyage dans la colonie. C'est aussi la cause la plus probable des contaminations inter-colonies. Les butineuses disséminent les spores dans leurs fèces hors de la ruche lors du butinage et de leurs vols de ménage. Une fleur précédemment visitée par un individu contaminé peut ainsi être à l'origine de l'infection d'une butineuse d'une autre colonie (Higes *et al.*, 2010). Le pouvoir infectieux de *N. ceranae* par ingestion a été estimé à 149 spores en moyenne (avec un minimum de 1,28 spores) nécessaires pour infecter un individu (McGowan *et al.*, 2016). Cette valeur est à comparer avec les millions de spores libérées dans les fèces d'un individu infecté.

Une contamination peut aussi se faire par **trophallaxie**, c'est-à-dire par le transfert de nourriture entre individus. Ce comportement est notamment observé entre les nourrices d'une part, les larves, la reine et les mâles d'autre part. Le rôle de la **dérive**, lorsque des butineuses intègrent une colonie qui n'est pas la leur, pourrait être un facteur de contamination inter-colonies mais il n'a pas été évalué.

Si le parasite a principalement une transmission horizontale, la détection de spores dans les organes reproducteurs de la reine et la semence des mâles suggère qu'une **transmission verticale** serait possible (Roberts *et al.,* 2015).

#### C.3.3. La germination et l'injection du sporoplasme

Après ingestion, les spores passent de la partie antérieure du tractus digestif vers l'intestin moyen. Dans cet environnement, les conditions physico-chimiques seraient optimales pour initier le mécanisme infectieux de la spore, déclenchant la **germination**, lors de laquelle le tube polaire est extrudé (**Fig. 28A, B**). L'augmentation de la pression osmotique interne de la spore, *via* le gonflement de la vacuole (**Fig. 27**) à la suite d'une entrée d'eau par des



**Figure 29. Possibles voies d'invasion d'une cellule hôte par** *N. ceranae.* 1) La spore injecte directement le sporoplasme dans la cellule hôte. 2) L'interaction entre la spore et la surface cellulaire induit l'extrusion du tube polaire et le sporoplasme est phagocyté dans une vacuole. 3) L'interaction entre la spore et la surface cellulaire induit l'injection du sporoplasme dans la cellule hôte et l'endocytose de la spore. 4) Phagocytose de la spore et éjection du sporoplasme du lysosome par le tube polaire. 5) Infection secondaire vers une cellule adjacente. 6) Phagocytose du tube polaire déjà extrudé. D'après Franzen (2005).

aquaporines membranaires, induit la dévagination du tube polaire, qui va permettre le **transfert du sporoplasme**, très rapide, vers la cellule hôte (Keeling & Fast, 2002 ; Franzen, 2005 ; Texier *et al.*, 2010). Plusieurs hypothèses sont envisagées concernant le mécanisme permettant le passage du sporoplasme dans la cellule hôte (**Fig. 29** ; Franzen, 2005). Une première hypothèse suggère que le tube polaire, après adhésion à la cellule hôte, traverserait la membrane pour injecter directement le sporoplasme dans son cytoplasme (Franzen, 2005). D'autres hypothèses proposent qu'un mécanisme de phagocytose ou d'endocytose interviendrait pour permettre la pénétration du sporoplasme, voire même de la spore complète qui extruderait alors son tube polaire une fois à l'intérieur de la cellule. Il n'est pas exclu que plusieurs de ces mécanismes puissent intervenir simultanément selon les circonstances de la rencontre entre la spore et la cellule.

## C.3.4. La prolifération et la différenciation intracellulaires

C'est dans le cytoplasme de la cellule hôte que va proliférer *N. ceranae* (**Fig. 28B**), d'autres microsporidies le faisant dans une vacuole parasitophore. Lors de la phase de prolifération ou **mérogonie**, le parasite va se multiplier sous forme de mérontes par scission binaire (Fries *et al.,* 1996 ; Higes *et al.,* 2010). Lors la mérogonie, des changements sont induits dans l'organisation de la cellule hôte. Outre un accroissement de la taille de la cellule, une migration des mitochondries a été observée autour des mérontes en multiplication (**Fig. 28C** ; Higes *et al.,* 2007), illustrant probablement le détournement des organites producteurs d'ATP par le parasite dépourvu de chaine respiratoire (Keeling & Fast, 2002 ; Higes *et al.,* 2010).

Suit alors une phase de maturation ou **sporogonie**. Les mérontes se différencient en sporontes, qui, après une dernière division, vont encore se différencier en sporoblastes. La différenciation des sporoblastes conduit à la formation de l'ensemble des organites et des éléments impliqués dans le mécanisme d'invasion (tube polaire, vacuole, polaroplaste). Les spores ne sont matures que lorsque l'endospore est entièrement constituée (Keeling & Fast, 2002).

Le développement du parasite conduit à la **lyse** de la cellule, disséminant les nouvelles spores dans la lumière intestinale de l'abeille et infectant éventuellement de nouvelles cellules. Les spores de *N. ceranae* seraient également capables de germinations intracellulaires pouvant infecter les cellules adjacentes (**Fig. 29**). Cela expliquerait la dissémination dans des tissus périphériques ainsi que la présence de spores vides dans certaines cellules infectées (Higes *et al.,* 2007 ; 2010).

Le cycle complet de *N. ceranae* dure trois jours (contre quatre pour *N. apis*), temps nécessaire pour observer des spores matures dans les cellules intestinales (Higes *et al.*, 2007). Par la suite, on observe rapidement une accumulation de spores dans l'ampoule rectale, jusqu'à atteindre plusieurs millions par abeille. Le rejet de déjections contaminées dans l'environnement permettra la contamination de nouveaux individus.



**Figure 30. Infection des cellules épithéliales de l'intestin moyen**, mais pas des cellules souches, par *N. ceranae*. **A.** Section d'intestin moyen avec marquage de *N. ceranae* avec une sonde ARN en orange, et révélation au DAPI (bleu) des noyaux de l'hôte (grande taille) et des parasites (petits points). Les cellules souches (flèches) ne sont pas infectées. A l'inverse la prolifération des parasites est visible en orange dans les cellules épithéliales (M : mérontes). Les spores matures (S) sont également visibles en bleu, notamment dans des cellules se détachant de l'épithélium. **B.** Schéma explicatif de l'infection de l'intestin moyen. Panek *et al.* (2018).



**Figure 31.** *N. ceranae* induit une chute du taux de tréhalose dans l'hémolymphe chez des abeilles sensibles ou tolérantes au parasite. Les concentrations moyennes chez les abeilles non infectées (blanc) et 6 jours après infection (bleu). Barres : intervalle de confiance à 95%. \* : différence significative (*p*<0,05 ; n=23 à 27). D'après Kurze *et al.* (2016).

# C.3.5. Le tropisme tissulaire

Selon les espèces, les microsporidies infectent différents tissus cellulaires. Nombre d'entre elles infectent leur hôte *via* le tractus digestif et infectent l'intestin, comme les *Nosema* chez l'abeille. Certaines espèces se développent cependant dans d'autres tissus, comme *Tubulinosema ratisbonensis* qui prolifère préférentiellement dans le corps gras de la drosophile (Franchet *et al.,* 2019). D'autres espèces peuvent aussi induire des infections plus systémiques comme *E. intestinalis* chez l'homme (Didier *et al.,* 2000 ; Weiss & Becnel, 2014).

*N. apis* et *N. ceranae* ont ; pour leur part ; un développement localisé aux **cellules épithéliales de l'intestin moyen** (Higes *et al.,* 2010). Les cellules souches basales ne sont pas infectées par *N. ceranae* (**Fig. 30** ; Panek *et al.,* 2018). Si certaines études moléculaires ont détecté par PCR *N. ceranae* dans d'autres tissus (glandes mandibulaires et salivaires, tubes de Malpighi, corps gras) (Chen *et al.,* 2009), cela pourrait être dû à une contamination lors de la dissection car le développement du parasite n'a pas été observé ailleurs que dans les cellules épithéliales intestinales (Huang & Solter, 2013 ; Higes *et al.,* 2019).

# C.4. Les impacts de N. ceranae sur A. mellifera

À **l'échelle individuelle**, l'infection par *N. ceranae* a des effets multiples, qui ont surtout été étudiés en laboratoire sur des petites cohortes d'individus, mais parfois aussi sur des colonies lors d'expérimentations de terrain. Les études ont permis d'identifier des impacts au niveau comportemental, physiologique, métabolique, ainsi que sur la survie des individus.

# C.4.1. Le détournement métabolique induirait un stress énergétique

Le développement du parasite est dépendant de sa capacité à détourner le métabolisme, notamment énergétique, de son hôte (*cf.* C.1.2., Paldi *et al.*, 2010). Le coût énergétique que représente l'infection par *N. ceranae* est donc l'un des premiers impacts sur la physiologie de l'abeille. Le **recrutement des mitochondries** autour des mérontes suggère une réorganisation de la cellule hôte pour optimiser le détournement de l'ATP (**Fig. 28C** ; Higes *et al.*, 2007 ; 2010).

Une diminution de la quantité d'oses (fructose, tréhalose), de glycols (sorbitol, glycérol) et d'acides aminés a été observée dans l'**hémolymphe** des abeilles infectées (Aliferis *et al.*, 2012). Pour les sucres et leurs dérivés, leur diminution serait liée à la capacité du parasite à les métaboliser par glycolyse, notamment le tréhalose qui est la principale molécule de réserve chez les insectes (**Fig. 31** ; Mayack & Naug *et al.*, 2010). Une telle diminution du tréhalose dans l'hémolymphe n'a pas été observée chez des abeilles tolérantes à *Nosema* chez lesquelles le pouvoir létal du parasite est moindre (Kurze *et al.*, 2016). Dans l'**intestin moyen**, l'infection induit une modification de l'expression de gènes de l'hôte impliqués dans le métabolisme des sucres, avec une surexpression des gènes codant l' $\alpha$ -glucosidase et des transporteurs du tréhalose ou une diminution de l'expression de la tréhalase (Aufauvre *et al.*, 2016).



Figure 32. Modulation de l'expression de gènes de l'immunité lors d'une infection par *N. ceranae*. A. Niveau moyen des transcrits codant 3 AMP et la glucose déshydrogénase 7 jours après avoir expérimentalement infecté des abeilles (bleu) ou non (blanc). Les données logarithmiques (base 2) de PCRQ ont été normalisées par rapport à deux gènes de ménage. Les étoiles indiquent une différence significative (p<0,05, n=15). D'après Antunez *et al.*, 2009. B. Expression moyenne de gènes codant des peptides antimicrobiens (à gauche) ou des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (à droite) dans l'abdomen de butineuses issues de colonies naturellement infectées par *N. ceranae* (bleu) ou saines (blanc). Les étoiles indiquent une différence significative (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001; n= 10 à 16). D'après Li *et al.* (2017).

2014). Dans certains cas, comme pour les acides aminés, il est difficile de discriminer ce qui résulterait d'un détournement au profit du parasite et ce qui résulterait d'une réponse à un stress énergétique de l'hôte.

Puisant dans les réserves de l'abeille, le parasite induirait en effet un **stress énergétique** qui augmenterait les besoins de l'insecte. En parallèle, la détérioration du tissu intestinal causée par la prolifération de *N. ceranae* (*cf.* C.4.3) réduirait ses capacités d'assimilation des nutriments. Chez des abeilles maintenues en cagettes et expérimentalement infectées, une consommation plus importante de saccharose a parfois été observée, mais pas systématiquement (Mayack & Naug, 2009 ; Alaux *et al.*, 2010 ; Martín-Hernández *et al.*, 2011 ; Vidau *et al.*, 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012). En limitant expérimentalement la prise de saccharose à des quantités précises, les abeilles infectées présentent une mortalité accrue par rapport aux abeilles saines et aux abeilles soumises à une alimentation *ad libitum* (Mayack & Naug, 2009). Dans les mêmes conditions, une diminution des transferts par trophallaxie a également été observée chez les abeilles infectées (Naug & Gibbs, 2009).

### C.4.2. La réponse immunitaire humorale

Chez l'abeille, *N. ceranae* semble principalement induire une réponse immunitaire humorale (*cf.* B.4.2). L'infection ne semble affecter ni le taux d'hémocytes dans l'hémolymphe, ni l'activité des phénol-oxydases médiatrices de la mélanisation, suggérant une faible réponse de l'immunité cellulaire (Alaux *et al.,* 2010). Le taux d'hémocytes est cependant dépendant de l'âge des abeilles, faible chez les jeunes ouvrières, ce qui complexifie les analyses faites sur des mélanges d'abeilles de tous âges (Martín-Hernández *et al.,* 2018).

Au niveau de l'intestin moyen, site de développement du parasite, celui-ci induit une modification de l'expression de gènes liés à l'immunité, avec la diminution de l'expression de gènes codant des AMP comme l'abaecine, l'hyménoptaecine, la défensine ou l'apidaecine mais aussi la vitellogénine (Vg) (Fig. 32A ; Antunez *et al.*, 2009 ; Chaimanee *et al.*, 2012 ; Dussaubat *et al.*, 2012 ; Aufauvre *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2017a). D'autres gènes liés à l'immunité humorale et cellulaire sont régulés en réponse à l'infection, comme les gènes basket et u-shaped, les gènes de reconnaissance du peptidoglycane bactérien, ou les gènes codant la sérine protéase 40 et la glucose oxydase (Dussaubat *et al.*, 2012 ; Aufauvre *et al.*, 2014; Antunez *et al.*, 2009). Des gènes codant des protéines antioxydantes comme des catalases ou une glutathion peroxydase (GP) sont également régulés (Dussaubat *et al.*, 2012 ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Aufauvre *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2017a). Cependant, la modulation de ces gènes semble fluctuer au cours de l'infection, avec l'âge et l'organe de l'abeille (Fig. 32B ; Chaimanee *et al.*, 2012 ; Schwarz & Evans, 2013 ; Li *et al.*, 2017a). Par exemple, l'expression de certains AMP semble stimulée, mais seulement au début de l'infection.

La réponse immunitaire à *N. ceranae* n'est pas localisée à l'intestin moyen et de telles réponses transcriptionnelles ont été observées sur des abeilles entières (Badaoui *et al.,* 2017).



**Figure 33.** *N. ceranae* inhibe la prolifération des cellules souches. Ratio cryptes actives / cryptes totales chez les abeilles saines (blanc) ou infectées (bleu) à différents temps après infection. dpi : days post infection. \* : différence significative par rapport au groupe non infecté. D'après Panek *et al.* (2018).



Figure 34. *N. ceranae* inhibe l'apoptose des cellules épithéliales de l'intestin **moyen.** La fréquence de cellules apoptotiques a été calculée par marquage fluorescent (TUNEL) chez des abeilles saines (-N, marqueurs vides) ou infectées (+N, marqueurs pleins) issues de colonies sensibles ou tolérantes au parasite (où le parasite est moins létal), 1 jour (vert) et 6 jours (bleu) après infection. \*\* : différence significative (*p*<0,01). D'après Kurze *et al.* (2015).

Des gènes liés au stress oxydant et codant la défensine et la glucose oxydase sont également régulés au niveau du cerveau en réponse à l'infection (McDonnell *et al.,* 2013).

L'ensemble de ces observations suggère que le parasite induit une **suppression immunitaire** (et aussi des capacités antioxydantes), notamment des voies Toll et Imd (Badaoui *et al.,* 2017).

# C.4.3. Un équilibre entre dégénérescence et renouvellement de l'épithélium

L'épithélium de l'intestin moyen de l'abeille, site de prolifération de *N. ceranae*, voit son intégrité affectée par l'infection. Les cellules épithéliales infectées montrent une hypertrophie et une dégénérescence, avec une vacuolisation et une lyse cellulaire (Higes *et al.*, 2007 ; Dussaubat *et al.*, 2012 ; Gregorc *et al.*, 2016). Elles finissent par se détacher de la membrane basale et sont libérées dans la lumière intestinale (**Fig. 30**). En outre, la membrane péritrophique apparait elle aussi fragmentée (Dussaubat *et al.*, 2012). La **dégradation de l'épithélium** et de la matrice péritrophique a des conséquences certaines sur les capacités d'assimilation des nutriments et de défense. De plus, le parasite semble contrôler négativement le renouvellement cellulaire et le mécanisme d'apoptose, ce qui faciliterait son développement (Panek *et al.*, 2018).

Le **renouvellement cellulaire** est un mécanisme de résilience majeur face au vieillissement des tissus, au stress oxydant et aux infections, en permettant de compenser les dommages cellulaires. Les cellules épithéliales superficielles altérées sont constamment remplacées grâce à la multiplication des cellules souches basales, qui vont ensuite migrer et se différencier (**Fig. 30**; Sahai-Hernandez *et al.,* 2012). La dégénérescence des cellules épithéliales chez les abeilles infectées s'accompagne d'une diminution de la mitose dans les cellules souches, bien que non infectées (**Fig. 33**; Panek *et al.,* 2018). De plus, les principaux gènes de la voie de signalisation Wingless, qui contrôle le renouvellement cellulaire, sont sous-exprimés chez les abeilles infectées (Dussaubat *et al.,* 2012).

L'**apoptose** est un mécanisme de défense contre les parasites intracellulaires (Lüder *et al.,* 2001). *N. ceranae* inhibe l'apoptose dans l'épithélium intestinale et modifierait la répartition des cellules apoptotiques, mais pas chez des abeilles tolérantes au parasite (**Fig. 34** ; Higes *et al.,* 2013 ; Kurze *et al.,* 2018). Le parasite réduirait l'apoptose par la surexpression de gènes codant des inhibiteurs de l'apoptose ou de protéines anti-apoptotiques associées aux cyclines (Kurze *et al.,* 2015 ; Martín-Hernández *et al.,* 2017).

Ainsi, l'équilibre entre dégénérescence et renouvellement de l'épithélium semble être la résultante de plusieurs phénomènes : d'une part la dégénérescence induite par la prolifération du parasite et par les mécanismes de défense de l'hôte et, d'autre part, une manipulation du parasite limitant l'apoptose et le renouvellement qui serait un moyen d'assurer son développement en limitant l'élimination des cellules infectées.



**Figure 35. Le réflexe d'extension du proboscis (PER). A. Principe :** à gauche, des abeilles sont maintenues dans des portoirs pour l'étude du PER. A droite, un stimulus conditionné (CS), ici une odeur, peut être appliqué sur les antennes en même temps qu'un stimulus non conditionné (US), par ex. du pollen ou du saccharose, est présenté au proboscis. Après le **conditionnement**, l'abeille étend son proboscis en réponse à l'odeur seule qui n'initiait aucune réponse au départ. Le simple test de **réactivité** consiste, lui, à observer l'apparition ou non de l'extension du proboscis en réponse au seul US. **B. Apprentissage :** il faut parfois plusieurs essais avant que toutes les abeilles acquièrent le PER (à gauche), parfois un maximum est atteint dès le premier essai sans que tous les individus répondent (à droite). **C. Mémoire :** elle est évaluée en répétant la présentation du CS après différents temps et en observant si le PER est maintenu. La mémoire est divisée en mémoire courte précoce (e-LTM) et tardive (I-STM), en mémoire à moyen terme (MTM) et en mémoire à long terme précoce (e-LTM) et tardive (I-LTM). Ici le fait de répéter l'apprentissage trois fois (3 CT) et non une seule fois (1 CT) augmente la capacité de mémoire. D'autres analyses sont possibles comme le test de **spécificité** qui consiste à observer un éventuel PER en réponse à un autre CS que celui utilisé pour le conditionnement. D'après Giurfa & Sandoz (2012).

### C.4.4. L'équilibre hormonal : vers un butinage précoce des abeilles infectées

Le développement de l'abeille adulte, associé au polyéthisme d'âge (cf. B.1.), s'accompagne de changements physiologiques contrôlés par des hormones. L'hormone juvénile (JH), produite dans le cerveau par le corpora allata, est particulièrement impliquée dans le contrôle du développement, de la larve jusqu'à la butineuse (Huang et al., 1991 ; Bomtorin et al., 2014). Entre autres cibles, la JH inhibe la production de vitellogénine (Vg), glycolipoprotéine produite et stockée dans le corps gras. La Vg contrôle négativement le développement de l'abeille et inhibe à son tour la JH. La concentration de JH augmente et celle de Vg diminue tout au long du développement et de la maturation de l'abeille. Des phéromones de contact qui sont transmises entre individus, comme l'oléate d'éthyle (EO), joueraient également un rôle dans le polyéthisme. L'EO est présent à forte concentration chez les butineuses, pratiquement absent chez les nourrices, et retarde le passage vers le stade de butineuse (Leoncini et al., 2004). Une variation dans la régulation de ces hormones pourrait donc occasionner des modifications temporelles dans la succession des tâches de l'abeille (Winston, 1987). Or, les abeilles infectées par N. ceranae présentent un taux de JH plus important dans l'hémolymphe que les non infectées (Ares et al., 2012) et une expression significativement réprimée du gène codant la Vg (Antunez et al., 2009). Elles produisent en revanche plus d'EO (Dussaubat et al., 2010, 2013a).

Ces observations suggèrent un rééquilibrage hormonal qui expliquerait, en partie au moins, que les abeilles infectées par *N. ceranae* montrent un **développement précoce vers les activités de butinage** (Goblirsch *et al.,* 2013 ; Lecocq *et al.,* 2016). La sortie précoce des butineuses, plus âgées et portant plus de parasites, serait à rapprocher d'une immunité comportementale. Elle pourrait en outre être liée à un stress énergétique stimulant la colonie dans la recherche des ressources (Toth *et al.,* 2005 ; Mayack & Naug, 2010).

## C.4.5. Les altérations du comportement et de la mémoire

Les capacités d'**apprentissage** et de **mémorisation** de l'abeille sont classiquement évaluées en étudiant le réflexe d'extension du proboscis ou PER (proboscis extension response) qui consiste à associer une récompense (saccharose) à une odeur (**Fig. 35**). Si Charbonneau *et al.* (2016) n'ont pas observé d'effet significatif de l'infection par *N. ceranae* sur l'apprentissage et la mémoire, Gage *et al.* (2018) ont observé des effets qui varient avec l'âge des abeilles. Les performances de mémoire étaient augmentées chez des nourrices âgées de 7 jours et les performances d'apprentissage et de mémoire étaient réduites chez des butineuses âgées de 15 jours par rapport aux performances des abeilles non infectées de mêmes âges.

Il est difficile de lier directement ces observations avec le comportement complexe des abeilles. Toutefois des effets de l'infection ont été observés sur les **activités de butinage**. Les butineuses infectées par *N. ceranae* effectuent un nombre plus important de sorties par jour et passent moins de temps dans la colonie entre deux sorties que les abeilles non infectées



**Figure 36. Modifications du comportement de butinage par** *N. ceranae.* De gauche à droite : temps moyen passé hors de la colonie par les butineuses, temps moyen dans la colonie entre deux sorties, contenu du jabot au retour à la ruche, et pourcentage de butineuses ne revenant pas à la colonie. Le nombre de butineuses étudié, qu'elles soient non infectées (en blanc) ou infectées (en bleu), est indiqué. D'après Naug (2014) et Wolf *et al.* (2014).

de la même colonie (**Fig. 36**; Dussaubat *et al.*, 2013a; Naug, 2014). Ces modifications comportementales pourraient être liées au stress énergétique que le parasite induit au niveau individuel. Le caractère eusocial des abeilles pourrait pousser celles qui sont infectées à augmenter leur activité plutôt que d'entamer les réserves de la colonie (Mayack *et al.*, 2013).

Les abeilles infectées montrent également un allongement significatif du temps de retour à la ruche et du temps de butinage (Kralj et Fuchs, 2010 ; Naug, 2014). Malgré tout cela, elles rapporteraient moins de nectar à la colonie (**Fig. 36**). Le taux de butineuses ne revenant pas à la colonie est aussi plus élevé chez les individus infectés. De plus, les capacités d'orientation semblaient altérées dans les travaux de Kralj et Fuchs (2010), bien qu'elles ne l'étaient pas significativement chez Wolf *et al.* (2014). Cette diminution du taux de retour pourrait en outre être liée à des phénomènes tels qu'une dérive vers d'autres colonies ou un abandon volontaire et altruiste de la colonie (*cf.* B.4.3.). Toutefois, Forfert *et al.* (2015) n'ont pas observé une augmentation de la fréquence de dérive chez les abeilles infectées, et l'abandon de la colonie est une hypothèse difficile à tester. Toutefois les comportements observés, qui ont pour conséquence une moindre présence des abeilles infectées dans la colonie, permettraient de réduire la transmission du parasite au sein de celle-ci.

# C.5. N. ceranae et nosémose : mortalités et controverses

*N. ceranae* provoque de nombreux effets individuels qui sont, à l'échelle de la colonie, censés provoquer une maladie appelée nosémose de type C (Higes *et al.,* 2010). Toutefois, il n'existe pas de symptôme spécifique et la présence du parasite est généralement asymptomatique au niveau de la colonie. Le symptôme le plus caractéristique serait la présence de fèces dans la ruche du fait des diarrhées qu'occasionnerait l'infection (Higes *et al.,* 2008), mais ceci est loin d'être systématique et semble surtout associé à l'infection à *N. apis*. La nosémose, en termes symptomatologiques, devient alors une maladie mal définie. La présence du parasite n'est révélée que par le diagnostic direct de la présence de spores par microscopie ou la détection moléculaire du génome parasitaire dans les abeilles. La question reste donc de savoir quel est le risque représenté par *N. ceranae* pour les colonies d'abeilles en termes de mortalité ou d'effondrement.

#### C.5.1. *N. ceranae* diminue la probabilité de survie des abeilles

À l'échelle individuelle, une infection expérimentale avec des spores de *N. ceranae* (classiquement de l'ordre d'une centaine de milliers de spores inoculées par abeille) affecte la survie d'abeilles maintenues en cagettes. Les durées de survie des abeilles infectées sont très variables d'une expérimentation à l'autre, mais sont toujours significativement plus faibles que celles des abeilles saines (voir p. ex. Paxton *et al.*, 2007 ; Higes *et al.*, 2008 ; Alaux *et al.*, 2010 ; Martín-Hernández *et al.*, 2011 ; Aufauvre *et al.*, 2012 ; Dussaubat *et al.*, 2012 ;



**Figure 37. Controverse sur le lien etre** *N. cerane* **et les effondrements de colonies. A.** Suivi d'une colonie naturellement infectée par *N. ceranae*, avec le pourcentage de butineuses (FB) et d'abeilles d'intérieur (IB) infectées (n=30) et le nombre de cadres occupés par des abeilles (bees) ou du couvain (brood). Quatre phases ont été décrites, menant à l'effondrement de la colonie (étoile). Les auteurs ont associé cet effondrement au taux d'infestation et à la forte charge parasitaire (non montré) de *N. ceranae*. D'après Higes *et al.* (2008). **B.** Occurrence de quatre pathogènes dans des colonies ayant subi un CCD ou non. Le parasite étant présent dans les colonies contrôles, les auteurs n'ont pas observé d'association entre *N. ceranae* et les effondrements de colonies. Ils ont plutôt suggéré une corrélation avec le virus IAPV. D'après Cox-Foster *et al.* (2007).

2013b). Les mortalités peuvent parfois être très importantes, avec des taux de mortalité de 100% en moins de trois semaines et un taux de mortalité proche de 90% en seulement une semaine dans l'étude de Higes *et al.* (2007).

Ces effets peuvent être estompés à l'**échelle de la colonie**. Celle-ci présente en effet une importante capacité de renouvellement de population, par l'activité de ponte de la reine, mais aussi de résistance au parasitisme, par l'immunité comportementale collective (*cf.* B.4.3). Il y a peu de données concernant les colonies. Villa *et al.* (2013) suggèrent toutefois un lien entre le taux d'infection et une diminution des populations des colonies infectées.

#### C.5.2. Le rôle controversé de N. ceranae dans les pertes de colonies

Les premières études associant *N. ceranae* à des pertes de colonies ont été effectuées en Espagne, lors de la recherche des pathogènes associées aux importants effondrements de colonies qui ont eu lieu entre 2004 et 2006 (Higes *et al.*, 2006 ; Martín-Hernández *et al.*, 2007). D'autres cas de surmortalité ou de pertes de colonies où le pathogène était prédominant ont par la suite été rapportés en Espagne (**Fig. 37A** ; Higes *et al.*, 2008 ; Botias *et al.*, 2013 ; Cepero *et al.*, 2014 ; Maena *et al.*, 2017), en Amérique du Sud (Bravo *et al.*, 2014), aux États-Unis (Villa *et al.*, 2013 ; Bekele *et al.*, 2015), au Moyen-Orient (Adjlane & Haddad, 2016), et en Europe méditerranéenne (Hatjina *et al.*, 2011 ; Lodesani *et al.*, 2014 ; Cavigli *et al.*, 2016). À l'inverse, dans d'autres régions des États-Unis et d'Europe, le parasite n'a pas semblé être associé à des pertes de colonies (Stevanovic *et al.*, 2013 ; Papini *et al.*, 2017). Par exemple, Cox-Foster *et al.* (2007), ont bien observé la présence du parasite dans les colonies atteintes de CCD, mais le parasite était également présent dans les colonies saines (**Fig. 37B**). Ces données contradictoires pourraient être liées aux conditions climatiques puisque ces régions moins touchées sont plutôt associées à des climats plus froids (Gisder *et al.*, 2010 ; Hedtke *et al.*, 2011 ; Stevanovic *et al.*, 2011 ; 2013 ; Dainat *et al.*, 2012 Francis *et al.*, 2014).

Le diagnostic moléculaire ou microscopique montre que le parasite peut être très prévalent mais que sa présence est généralement asymptomatique. La variation entre l'infection délétère du parasite et sa présence asymptomatique suggère une variation de la virulence de *N. ceranae* (Invernizzi *et al.,* 2009).

## C.5.3. Les hypothèses sur la variation de la virulence de *N. ceranae*

La virulence dépend des interactions abeille-parasite et peut varier avec le polymorphisme du parasite (existence de variants plus ou moins virulents), celui de l'abeille (capacités de résistance ou de tolérance), et avec les conditions environnementales dans lesquelles se font ces interactions (Invernizzi *et al.,* 2009).

Concernant le **polymorphisme génétique de** *N. ceranae*, les études conduites sur la diversité nucléotidique de marqueurs génétiques ou sur les génomes d'isolats géographiquement distants n'ont pas mis en évidence de variations qui justifieraient l'existence de variants

parasitaires (voir p. ex. Sagastume *et al.,* 2011, Chaimanee *et al.,* 2011; Dussaubat *et al.,* 2013b; Roudel *et al.,* 2013; Pelin *et al.,* 2015). Certes, le parasite présente une importante diversité nucléotidique mais celle-ci est autant présente au sein même des colonies qu'entre colonies géographiquement distantes (Roudel *et al.,* 2013). Il faut élargir le spectre d'hôte du parasite à d'autres espèces des genres *Apis* ou *Bombus* pour observer des clades parasitaires distincts (Chaimanee *et al.,* 2011; Li *et al.,* 2012).

À ce jour, aucune sous-espèce d'*A. mellifera* n'a clairement montré une résistance ou une tolérance au parasite, comme c'est le cas pour l'hôte d'origine *A. cerana*. Des différences dans le succès parasitaire entre colonies peuvent être observées mais elles ont été plutôt liées à l'historique des colonies (*cf.* E.2., Fontbonne *et al.*, 2013). Depuis les années 1990 l'association des apiculteurs danois (Danmarks Diavlerforening) a organisé un programme de sélection artificielle fondée, entre autres caractères, sur la sélection de reines de colonies restées sans infection depuis des années (Hatjina *et al.*, 2014). Bien que les abeilles des colonies tolérantes présentent une plus forte charge sporale que celles des colonies sensibles, elles montrent un plus faible taux de mortalité, une réponse immune surexprimée et une capacité de réduire la manipulation de l'apoptose par le parasite (**Fig. 34**; Huang *et al.*, 2012; Kurze *et al.*, 2015). Il y aurait donc bien des mécanismes **génétiques ou épigénétiques transmissibles chez l'abeille** qui influenceraient sa sensibilité au parasite.

Les **conditions environnementales** et les autres facteurs de stress auxquels la colonie est exposée pourraient grandement influencer la virulence de *N. ceranae*. Les microsporidies sont souvent considérées comme des parasites opportunistes qui profiteraient de l'affaiblissement de leur hôte pour se développer. Un tel affaiblissement peut être lié aux nombreux facteurs de stress que subit l'abeille (*cf.* A.3.). La quantité et la qualité des ressources est un facteur crucial pour la santé des abeilles. Mayack & Naug (2009) suggèrent qu'une réduction des ressources accessibles aurait un effet négatif sur la survie des abeilles infectées par *N. ceranae*, qui ne pourraient compenser le stress énergétique induit par l'infection. De même, un lien a été établi entre la qualité (fraicheur, richesse) du pollen et une hausse de mortalité des abeilles liée à *Nosema* (Maes *et al.*, 2016 ; Di Pasquale *et al.*, 2013). À l'inverse l'apport de pollen augmente significativement la survie des abeilles infectées en laboratoire (Porrini *et al.*, 2011 ; Di Pasquale *et al.*, 2013). Enfin, un phénomène important dans la régulation de la virulence de *N. ceranae* semble son interaction avec d'autres facteurs de stress, notamment les insecticides (*cf.* Chap. E). **Tableau V. Les grandes étapes de l'utilisation des insecticides en agriculture**, avant l'arrivée de nouvelles générations de molécules. D'après Flint & van den Bosch (1981).

Date	Event
8,000 в.с.	Beginnings of agriculture
4,700 в.с.	Silkworm culture in China
2,500 в.с.	First records of insecticides
1,500 в.с.	First descriptions of insect pests
950 в.с.	First descriptions of cultural controls
300 a.d.	First record of use of biological controls (predatory ants used in citrus orchards in China)
1750-1880	Agricultural revolution in Europe
Early 1800s	Appearance of first books and papers devoted entirely to pest control
1870-1890	Grape phylloxera and powdery mildew controlled in French wine country (introduction of Bordeaux mixture and Paris Green)
1880	First commercial pesticide spraying machine
1896	First selective herbicide (iron sulfate)
1921	First aircraft spray (in Ohio for catalpa sphinx)
1930s	Introduction of synthetic organic compounds for plant pathogen control
1939	Recognition of insecticidal properties of DDT
1940s	Organophosphates developed in Germany, carbamates in Switzerland
1944	First hormone-based herbicide (2,4-D)
1946	First report of insect resistance to DDT (housefly in Sweden)
1950s, 60s, 70s	Widespread development of resistance to DDT and other pesticides
1959	Introduction of concepts of economic thresholds and integrated control
1972	Banning of DDT in United States

**Tableau VI. Les dix plus gros consommateurs de pesticides et d'insecticides** dans le monde entre 2007 et 2017. Les rangs sont indiqués, ainsi que les consommations moyennes annuelles (en milliers de tonnes par an) et les quantités moyennes annuelles par unité de surface cultivée (en kg/ha/an). Les données de la décennie précédente sont indiquées à titre de comparaison. FAOSTAT (2020).

Les 10 premiers consommateurs de pesticides					Les 10 premiers consommateurs d'insecticides									
	2	007-20	17	1	997-20	07		2007-2017		1	1997-2007			
Pays	rang	kt/an	kg/ha	rang	kt/an	kg/ha		Pays*	rang	kt/an	kg/ha	rang	kt/an	kg/ha
Chine	1	1750	13,9	1	1359	10,7		Etats-Unis	1	69	0,17	1	85	0,2
Etats-Unis	2	395	2,5	2	416	2,4		Brésil	2	65	0,28	2	38	0,17
Brésil	3	351	5,6	3	179	3,2		Japon	3	19	4,26	3	24	4,91
Argentine	4	201	5,2	4	110	3,6		Inde	4	13	0,08	4	23	0,14
Canada	5	70	1,8	12	39	1		Italie	5	11	1,17	8	12	1,08
Ukraine	6	69	2,1	19	27	0,8		Turquie	6	11	0,46	5	14	0,54
France	7	69	3,6	5	90	4,6		Australie	7	10	0,35	15	8	0,31
Italie	8	67	7,1	6	83	7,7		Ukraine	8	10	0,3	22	4	0,11
Malaisie	9	56	7,4	11	40	5,9		Espagne	9	9	0,55	7	12	0,65
Japon	10	55	12,1	8	72	15		Mexique	10	9	0,38	18	5	0,21

\* Il n'y a pas de données concernant les insecticides en Chine.

# **D.** LES INSECTICIDES NEUROTOXIQUES CHEZ L'ABEILLE

Cette section porte sur les insecticides neurotoxiques utilisés en agriculture ou en apiculture, et que l'on retrouve dans les colonies, ainsi que sur leurs effets sur l'insecte non cible qu'est l'abeille. Parmi les molécules les plus communément utilisées à travers le monde, six vont nous intéresser ici. Elles appartiennent à quatre familles d'insecticides :

- les néonicotinoïdes, avec l'imidaclopride, le thiaméthoxame et le thiaclopride,
- les pyréthrinoïdes, avec la deltaméthrine,
- les phénylpyrazoles, avec le fipronil,
- les organophosphorés, avec le coumaphos qui est aussi un acaricide.

# **D.1. Historique et consommation actuelle**

#### D.1.1. Vers des molécules synthétiques sélectives et actives à faible dose

L'apport d'intrants destinés à protéger les cultures est une pratique multimillénaire. Les premières utilisations de composés sulfurés par les sumériens ont plus de 4500 ans (**Tab. V**). Jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle les traitements consistaient principalement en l'application de substances inorganiques telles que le cuivre, l'acide sulfurique ou le chlorate de sodium, ou de substances organiques extraites d'animaux ou de plantes (Flint & van den Bosch, 1981). Les premiers pesticides synthétiques ont été utilisés à partir du XIX<sup>e</sup> siècle grâce au développement industriel et pétrochimique. L'usage de ces pesticides a cependant connu un véritable essor après la Seconde Guerre Mondiale. Les avancées réalisées dans le domaine de la chimie, poussées par le secteur militaire, avec notamment la mise au point de divers gaz innervants, ont abouti à l'apparition de nouveaux pesticides aux propriétés neurotoxiques comme les organochlorés, les organophosphorés ou les carbamates.

Les **insecticides** utilisés jusqu'à aujourd'hui sont principalement des **neurotoxiques** qui perturbent les neurotransmissions de l'organisme. L'avantage de ces insecticides est leur action immédiate sur les nuisibles. Ils induisent un dérèglement des fonctions motrices (paralysie) et cognitives conduisant presque instantanément à la mort (Casida & Quistad, 2004 ; Casida & Durkin, 2013). Le plus connu est certainement le DDT (dichlorodiphényl-trichloroéthane), un organochloré utilisé intensivement dans les années 1950-1970 pour ses propriétés insecticide et acaricide et son spectre d'activité très large (Hellou *et al.,* 2013). Ces molécules ont joué un rôle important dans la protection des cultures, augmentant considérablement les rendements et baissant les coûts de production, mais aussi dans la protection des populations dans le cadre de luttes antivectorielles. Par exemple, le DDT a été utilisé contre le moustique pour l'éradication du paludisme en Europe et en Amérique du Nord (Hellou *et al.,* 2013). Cependant, en quelques années des insectes résistants sont apparus, réduisant fortement l'efficacité de ces insecticides et contraignant à limiter leur



**Figure 38. Evolution de l'utilisation des classes d'insecticides.** Les données sont basées sur le marché des Etats-Unis jusqu'à la fin des années 1970 puis sur le marché mondial. OC : organochlorés (par ex. DDT, dieldrine), OP : organophosphorés (chlorpyrifos, coumaphos, malathion), CAR : carbamates (aldicarb, methiocarb), Pyr : pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine, fluvalinate), Neo : néonicotinoïdes (imidaclopride, thiaclopride, clothianidine), DA : Diamides (chlorantraniliprole, flubendiamide), Others (incl. spinosynes, avermectines, formamidines, phenylpyrazoles, etc.). D'après Sparks *et al.* (2019).





**Figure 39. Les insecticides les plus utilisés** entre 1990 et 2012 au Japon (**A**) et en Grande Bretagne (**B**), et entre 1992 et 2011 aux Etats-Unis (**C**). D'après Simon-Delso *et al.* (2014) et Douglas & Tooker (2015).

usage (Georghio & Mellon, 1983 ; Denholm *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'utilisation massive de ces substances a contribué à la contamination de l'environnement, atteignant ainsi un nombre important d'espèces non-cibles. En outre, leur toxicité pour les mammifères n'est pas négligeable (Hellou *et al.*, 2013). Tout cela a conduit à des restrictions d'usage voire à l'interdiction de certains de ces insecticides, stimulant la mise au point de nouvelles substances plus sélectives (avec un mode d'action plus ciblé sur certaines espèces) et efficaces à plus faibles doses (Handford *et al.*, 2015).

Ces **nouvelles générations d'insecticides** comprennent les pyréthrinoïdes, qui apparaissent sur le marché dès les années 1970, puis les phénylpyrazoles et les néonicotinoïdes, dans les années 1980-1990 (Casida & Quistad, 1998). Ces derniers possèdent par ailleurs des propriétés systémiques permettant une diffusion de la molécule dans l'ensemble de la plante traitée (Simon-Deslo *et al.*, 2014 ; Bonmatin *et al.*, 2015). Si ces nouvelles substances ont été considérées comme des alternatives moins néfastes pour l'environnement, elles sont aujourd'hui incriminées à leur tour. Quelques années seulement après leurs premières utilisations, des signes de résistance à ces nouvelles générations d'insecticides sont apparus (Szendrei *et al.*, 2012 ; Bass *et al.*, 2015) et leur action ciblée a été remise en cause par l'observation d'effets sur des espèces non cibles, dont des insectes pollinisateurs mais aussi des vertébrés (EFSA, 2012 ; 2013 ; 2015 ; Lopez-Antia *et al.*, 2013 ; 2015).

## D.1.2. Une consommation soutenue de pesticides dans le monde

La production et l'usage de pesticides augmente globalement de façon constante depuis les années 1960 (FAOSTAT, 2020 ; Sharma *et al.*, 2019). Les plus gros consommateurs actuels de pesticides sont la Chine, les États-Unis et le Brésil (**Tab. VI** ; Sharma *et al.*, 2019). Les Etats-Unis et le Brésil sont également les plus gros consommateurs d'insecticides mais les données sont manquantes pour la Chine. La France est le premier pays agricole de l'Union Européenne, avec 29 millions d'hectares de surface agricole, représentant une valeur de 69 M€ en 2011 (Inserm, 2013). Elle reste le plus gros consommateur de phytopharmaceutiques de l'Union Européenne, mais pas d'insecticides, où elle se situe derrière l'Italie, l'Espagne, l'Allemagne et la Grèce sur la période 2007-2017 (FAOSTAT, 2020). En tonnage, les neurotoxiques représentent une faible portion de la consommation totale de pesticides, notamment en raison de l'utilisation à des doses plus faibles des insecticides de nouvelle génération, mais ils représentent une importante part de marché (Sparks *et al.*, 2019).

Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation des organophosphorés et des carbamates a décliné (**Fig. 38**) et de nombreuses substances de ces familles ont été interdites pour leur toxicité pour l'homme et l'environnement. Celle des pyréthroïdes a diminué dans une moindre mesure, alors que celle des néonicotinoïdes a augmenté (**Fig. 39**) pour s'infléchir ces dernières années. Leur utilisation varie cependant en fonction des cultures et des réglementations.

**Figure 40 : Modes d'action des insecticides neurotoxiques** utilisés dans de cette étude. A part pour les pyréthrinoïdes, sur chaque figure sont représentées une terminaison pré-synaptique productrice de neurotransmetteur (ACh, GABA) et la cellule post-synaptique. D'après Casida & Durkin (2013).



# Organophosphates : AChE inhibitors



# Pyrethroids : sodium channel modulators



#### 1 Mode d'action des néonicotinoïdes

Seuls les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChR), couplés à un canal ionique, sont concernés. La fixation de l'ACh provoque l'ouverture du canal et le passage des ions sodium, induisant une excitation post-synaptique. Les néonicotinoïdes (N) sont des agonistes du nAChR : en se fixant sur le site récepteur de l'ACh, ils induisent une hyperstimulation.

# **2** Mode d'action des organophosphorés

La stimulation post-synaptique par fixation de l'ACh sur ses différents types de récepteurs est rapidement inhibée par l'hydrolyse du neurotransmetteur par l'acétylcholine estérase (AChE). Les organophosphorés comme le coumaphos (C), inhibent l'AChE par phosphorylation, induisant une hyperstimulation.

#### **3** Mode d'action des pyréthrinoïdes

Ce sont des modulateurs des canaux sodiques du système nerveux périphérique. En se fixant sur les canaux, la deltaméthrine (D) empêche leur inactivation et affecte la dépolarisation de la membrane. Elle agirait également sur certains canaux calciques.

#### Phenylpyrazoles : non competitive GABA antagonists



#### 4 Mode d'action des phénylpyrazoles

Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur. Il se fixe sur un domaine extracellulaire d'un complexe récepteur/canal ionique et provoque le passage des ions chlorure, induisant un potentiel inhibiteur. Le fipronil (F) est un antagoniste non compétitif du complexe récepteur : en se fixant sur un autre site il bloque le flux d'ions et empêche l'inhibition du signal.

# **D.2.** Utilisation et modes d'action de quatre classes d'insecticides neurotoxiques

# D.2.1. Les néonicotinoïdes : l'imidaclopride, le thiaméthoxame, le thiaclopride

#### D.2.1.1. Des agonistes des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

Les néonicotinoïdes appartiennent à une classe d'insecticides mise au point en 1991 et dérivées de la nicotine qui était déjà utilisée autrefois comme insecticide d'origine naturelle. Les néonicotinoïdes ciblent les **récepteurs postsynaptiques nicotiniques de l'acétylcholine** (nAChR, **Fig. 40**) qui étaient alors des cibles peu exploitées dans le contrôle des insectes ravageurs (Casida & Durkin, 2013 ; Taillebois *et al.,* 2018 ; Sparks *et al.,* 2019). À l'instar de l'acétylcholine (ACh), les néonicotinoïdes se lient aux différents sous-types de nAChR, ce qui a pour conséquence une ouverture du canal ionique induisant une stimulation nerveuse. Ils ont donc une action agoniste de l'ACh. Cependant, n'étant pas dégradés par l'acétylcholinestérase (AChE), il en résulte une hyperstimulation prolongée du système nerveux central (SNC), provoquant une paralysie qui est rapidement fatale à l'insecte.

Les néonicotinoïdes ont été développés selon leur affinité préférentielle pour les nAChR des invertébrés, permettant une moindre toxicité pour les vertébrés (Liu *et al.*, 2010), et leur très forte toxicité sur les insectes, offrant une efficacité à très faible dose. Il existe des différences structurales entre les nAChR des insectes et des vertébrés (Tomizawa et Casida, 2003). Si la nicotine est particulièrement toxique pour les mammifères, la sélectivité des néonicotinoïdes induit à l'inverse une toxicité bien plus importante chez les insectes. La toxicité de ces molécules est généralement déterminée selon la valeur de leur dose létale 50 (LD<sub>50</sub>, **Encadré**) et est parfois comparée à celle du DDT qui peut être définie comme une valeur de référence. Les LD<sub>50</sub> de ces molécules de nouvelle génération sont bien plus basses que celles des organophosphorés ou organochlorés, y compris chez *A. mellifera* (**Tab. VII**). Ainsi, bien que ces substances soient utilisées à plus faibles doses, mêmes de faibles quantités sont susceptibles d'affecter l'abeille. Par exemple, l'imidaclopride possède une toxicité pour les insectes 10 000 fois supérieure à celle du DDT (Suchail *et al.,* 2000). L'imidaclopride serait cependant un agoniste partiel des nAChRs contrairement à d'autres néonicotinoïdes, d'où des toxicités variables au sein de cette famille chimique (Déglise *et al.,* 2002 ; Tan *et al.,* 2007).

#### D.2.1.2. Les insecticides systémiques les plus utilisés en agriculture

Depuis l'introduction de l'imidaclopride sur le marché en 1991, six autres molécules ont été commercialisées : le nitenpyrame, l'acétamipride, le thiaméthoxame, le thiaclopride, le dinotéfurane et la clothianidine (qui est aussi le principal métabolite du thiaméthoxame) (Bass *et al.*, 2015). Parmi les formulations les plus connues, on peut citer le Cruiser<sup>®</sup>, le Gaucho<sup>®</sup> ou encore le Calypso<sup>®</sup> (**Tab. VII**). Bien qu'arrivés plus récemment sur le marché, les néonicotinoïdes sont aujourd'hui les insecticides les plus vendus au monde, remplaçant

#### Evaluation de la toxicité aigüe des insecticides : la dose létale 50

Quelle que soit la nature des molécules commercialisées pour le contrôle des nuisibles, la réglementation impose une évaluation de leur toxicité vis-à-vis de l'environnement et de la santé des individus sur différents organismes modèles. Si le rat ou la souris représentent des modèles proches de l'Homme, l'abeille est un modèle représentatif des insectes non cibles, en particulier des pollinisateurs. Une toxicité aiguë est donc généralement déterminée pour l'abeille à l'issue des tests d'exposition par voie orale ou topique (c-à-d. par contact). La valeur généralement retenue est la dose létale à 50% (DL<sub>50</sub> ou LD<sub>50</sub> pour *lethal dose 50*), correspondant à la dose de molécule active entrainant la mort de 50% des individus après 24 h ou 48 h (**Fig. 41**).



**Figure 41.** La LD<sub>50</sub> : courbes dose-mortalité d'ouvrières de l'abeille *Melipona quadrifasciata* exposées oralement aux insecticides imidaclopride et spinosad (un lactone macrocyclique isolé d'un actinomycète du sol). Les pointillés montrent les intervalles de confiance à 95%. Les LD<sub>50</sub> des ingrédients actifs sont indiquées sous l'axe des abscisses. D'après Tomé *et al.* (2015).

La LD<sub>50</sub> varie avec la molécule, le modèle animal et la voie d'administration. Chez l'abeille mellifère, elle varie aussi considérablement selon la vigueur des colonies, les apports nutritionnels ou et les protocoles d'expositions (par ex. pour une exposition par contact par dépôt sur le thorax, les ailes, etc.), ainsi qu'avec la présence d'adjuvants dans des formulations commerciales (Decourtye & Devilliers, 2010 ; Poquets *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2019). Les insecticides présentent des LD<sub>50</sub> très variables en fonction des familles et des espèces moléculaires. Les nouvelles générations d'insecticides (pyréthrinoïdes, néonicotinoïdes, fipronil) ont des LD<sub>50</sub> plus faibles et donc des toxicités plus fortes sur abeille (**Fig. 42**).



**Figure 42.** LD<sub>50</sub> par famille d'insecticides chez l'abeille mellifère. FIP: fipronil, NEO: néonicotinoïdes, SPIN: spinosad, PYR: pyréthroïdes, CARB: carbamates, OP: organophosphorés, OC: organochlorés, INORG : inorganiques. D'après Douglas *et al.* (2020).

rapidement les anciennes générations de substances, face auxquelles certaines espèces de nuisibles commençaient à développer une résistance (Georghio & Mellon, 1983 ; Denholm *et al.*, 1998). En 2012 et 2017, ils représentaient près d'un quart du marché des insecticides (**Fig. 38**) dont 85% étaient représentés par trois molécules : l'imidaclopride, le thiaméthoxame et la clothianidine (Bass *et al.*, 2015 ; Sparks *et al.*, 2019).

Les néonicotinoïdes sont appliqués par pulvérisation foliaire, dispersion de granulés ou par enrobage des semences. Ce sont des insecticides systémiques qui, notamment grâce à leur très forte solubilité dans l'eau, pénètrent et diffusent dans l'ensemble de la plante, la protégeant durablement des ravageurs. Les trois néonicotinoïdes étudiées dans cette thèse n'ont pas toutes la même toxicité et sont utilisées sur une grande variété de cultures (**Tab. VII**). Certains néonicotinoïdes sont également présents dans des formulations utilisées sur animaux.

#### D.2.1.3. Impacts environnementaux et conséquences réglementaires

La persistance des néonicotinoïdes dans l'environnement (**Tab. VII**) et leur grande solubilité dans l'eau accentue leur potentiel contaminant, notamment vers les zones initialement nontraitées, et donc leur impact sur des populations non cibles (Goulson *et al.*, 2013). Même de très faibles quantités de néonicotinoïdes induiraient des surmortalités ou des effets sublétaux délétères à la suite de leur bioaccumulation dans les organismes. Plusieurs études établissent que les néonicotinoïdes touchent largement les écosystèmes, avec des impacts sur les pollinisateurs, dont les abeilles et les bourdons (Whitehorn *et al.*, 2017 ; Wood *et al.*, 2018, mais également sur les prédateurs de nuisibles (oiseaux) ou encore sur les organismes présents dans les sols (ver de terre) et les eaux (EFSA, 2012 ; 2013 ; 2015). Par ailleurs, la dégradation de ces molécules peut conduire à la production de multiples métabolites (Simon-Delso *et al.*, 2015) dont l'impact est mal connu. Certains métabolites comme le dérivé oléfine de l'imidaclopride ou la clothianidine, métabolite du thiaméthoxame, présentent des toxicités supérieures à leurs molécules mères chez *A. mellifera* (Suchail *et al.*, 2001).

Au cours des dernières années, l'usage des néonicotinoïdes a été de plus en plus restreint, surtout dans le domaine agricole. Alors que le dinotéfurane et le nitenpyrame n'ont pas été approuvés en Europe, l'exposition chronique à l'imidaclopride, au thiaméthoxame et à la clothianidine a été considérée comme dangereuse pour de nombreux invertébrés non-cibles par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) en 2013. En conséquence, la Commission Européenne a voté une suspension de l'usage de ces trois substances en enrobage de semences, puis leur interdiction en 2018. La France a interdit, depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2018, l'usage des cinq néonicotinoïdes encore sur le marché dans la majorité des systèmes agricoles. Néanmoins ces substances sont encore largement utilisées dans le reste du monde et sont encore appliquées en France et en Europe sous dérogation. De nouvelles molécules ont été mises au point pour pallier l'interdiction progressive des néonicotinoïdes. Parmi ces "alternatives", le sulfoxaflor et le flupyradifurone, dont les modes d'action sont proches de celui des néonicotinoïdes, nourrissent déjà des polémiques quant à leur utilisation.

une seul prise 50% des indiv avec un mammifère modèle ( <i>sitem.herts.ac.uk/aeru/ppd</i>	idus en 24 ou 48h) pour le . Pour information la mas b/) et Veterinary Substan	es a beilles, par contact et p se moyenne d'une abeille « ces DataBase ( <i>sitem. herts.</i>	ar ingestion sont indiqué. est de l'ordre de 80 mg, cı ac. <i>uk/aeru/vsdb/</i> ) pour le	ss. Elle est également indi elle d'un rat de 350 g. Sou s valeurs entre parenthès	quée pour le rat (par voie c rces : Pesticide Properties I e, Sanchez-Bayo <i>et al.</i> (201	rrale) pour comparaison DataBase 4) pour les autres.
Famille		Néonicotinoïdes		Pyréthrinoïdes	Phénylpyrazoles	Organophosphorés
Insecticide	Imidaclopride	Thiaméthoxame	Thiaclopride	Deltaméthrine	Fipronil	Coumaphos
Formule moléculaire	HNNN	H <sub>3</sub> C M C C	C N S	A Contraction of the second se	NC NC S S F <sub>3</sub> C NH <sub>2</sub> C	H <sub>3</sub> C CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
Mode d'action		Agonistes de l'acétylcholine		Modulateur des canaux sodiques	Antagoniste du GABA	Inhibiteur de l'AChE
Date d'homologation	1991	1998	2000	1978	1993	1958
DT <sub>50</sub> dans le sol (jour)	104 - 228	7 - 72	6 - 17	7 - 28	6 - 135	100 - 300
LD <sub>50</sub> topique (ng/abeille)	61 (81)	25 (24)	36 000 (38 800)	24 (1,5)	7 (5,9)	20 000
LD <sub>50</sub> orale (ng/abeille)	13 (3,7)	5 (5)	17 000 (17 300)	270 (70)	1 (1,5)	4 600
LD <sub>50</sub> orale (µg/g rat)	424	> 1 500	177	87	92	7,1
Exemple de formulations	Gaucho® (Bayer) Confidor® (Bayer)	Cruiser® (Syngenta) Thiaprole® (Eurofyto) Axoris® (Compo)	Calypso® (Bayer) Proteus® (Bayer)	Decis® (Bayer) Proteus® (Bayer)	Regent® (BASF) Jumper® (BASF) Frontline® (Merial)	CheckMite+® (Bayer) Perizin® (Bayer) Asuntol® (Bayer)
Application	Enrobage de semence Granulé pour le sol Pulvérisation	Enrobage de semence Granulé pour le sol Pulvérisation	Enrobage de semence Granulé pour le sol Pulvérisation	Pulvérisation	Enrobage de semence Granulé pour le sol Pulvérisation Préparation liquide	Bandelette Préparation liquide
Principaux usages	Cultures : céréales, betterave, arbres fruitiers	Cultures : maïs, pois, vignes, pomme de terre, arbres fruitiers	Cultures : céréales, pois, betterave, fruits	Cultures : céréales, pois, betterave	Cultures : céréales, betterave Elevage : contre tiques, puces, poux	Elevage : contre tiques, puces, poux Apiculture : contre Varroa et A. tumida
Réglementation européenne	Restriction d'usage, interdit en France	Interdit	Interdit	Approuvé	Interdit en agriculture et élevage	Interdit

Tableau VII : Quelques données sur les insecticides étudiés dans ce travail. La DT<sub>50</sub> (degradation time) représente la demi-vie de la molécule dans le sol. Les LD<sub>50</sub> (dose létale tuant en

### D.2.2. Un organophosphoré : le coumaphos

#### D.2.2.1. Un inhibiteur de l'acétylcholinestérase

Les insecticides organophosphorés existent sous une grande variété de structures moléculaires principalement développées jusqu'au milieu des années 1980 (Testud & Grillet, 2007). Le mode d'action de ces insecticides est cependant commun puisqu'ils ont été développés pour **inhiber l'acétylcholinestérase** (AChE) qui était alors une cible couramment exploitée dans le contrôle des insectes nuisibles. L'AChE hydrolyse l'ACh au niveau des régions synaptiques des terminaisons nerveuses cholinergiques (Casida & Durkin, 2013). Les organophosphorés, dont fait partie le coumaphos, désactivent l'AChE par phosphylation, ce qui induit une accumulation d'ACh et une stimulation excessive des récepteurs cholinergiques. Il en résulte une hyperstimulation du SNC fatale pour l'insecte (**Fig. 40**).

S'il existe des différences moléculaires entre les AChE des insectes et des vertébrés, conduisant à des différences d'affinité, et donc de toxicité, selon les molécules insecticides, les risques qu'exposent les organophosphorés aux mammifères sont bien plus importants que pour les néonicotinoïdes, avec par exemple une atteinte de la spermatogénèse et une fœtotoxicité (Gupta, 2006). Ces effets délétères ont joué un rôle important dans la diminution de l'usage des organophosphorés. L'apparition récurrente de phénomènes de résistance chez de nombreux insectes, à la suite de mutation de leur AChE, a contribué à accélérer leur déclin (Villatte *et al.*, 2000 ; Jett, 2011 ; Sparks *et al.*, 2019).

#### D.2.2.2. Utilisation vétérinaire et restrictions d'usage

Le coumaphos a des propriétés insecticides et acaricides, d'où des utilisations variées sur cultures et en élevage. Il est principalement utilisé en Amérique du Nord dans les formulations Perizin<sup>®</sup> ou CheckMite<sup>®</sup> (**Tab. VII**) pour le contrôle des puces, poux, tiques et autres acariens chez les animaux de ferme et domestiques.

Il est aussi appliqué par les apiculteurs à l'intérieur des ruches comme traitement anti-*Varroa* et contre le petit coléoptère des ruches. Son application se fait sous forme liquide ou sous forme de bandelettes imprégnées qui diffusent la substance dans l'ensemble de la ruche et dans l'abeille. La molécule se retrouve notamment dans la cire du fait de son caractère lipophile (Kast *et al.*, 2020). Les effets négatifs sur l'abeille (*cf.* D.4.) et la grande persistance du coumaphos dans les matrices de la ruche (Martel *et al.*, 2007 ; Karazafiris *et al.*, 2008 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Johnson *et al.*, 2010) ont conduit à de fortes restrictions d'usage et à son abandon en Europe. Cependant, la substance est encore détectée dans des cires recyclées (Lodesani *et al.*, 2008). Aux États-Unis, pays faisant aujourd'hui le plus l'usage du coumaphos, le parasite *V. destructor* a développé depuis déjà quelques années une résistance à cet acaricide (Elzen & Weservelt, 2002).

#### D.2.3. Un pyréthrinoïde : la deltaméthrine

#### D.2.3.1. Un modulateur des canaux sodium voltage-dépendants

Les pyréthrinoïdes sont des analogues synthétiques de subtances naturelles comme les pyréthrines extraites de fleurs de chrysanthèmes depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle pour leur activité insecticide (Palmquist *et al.*, 2012). On distingue aujourd'hui deux types de pyréthrinoïdes. Le type I regroupe les premières molécules développées dès les années 60, comme la tétraméthrine ou la perméthrine. Le type II constitue la nouvelle génération de molécules avec une action de plus longue durée grâce à une plus grande stabilité. La deltaméthrine est l'un des pyréthrinoïdes de type II les plus efficaces car la synthèse sélective de son énantiomère actif est possible (Mondière & Benfatti, 2016 ; Rehman *et al.*, 2014).

Contrairement aux autres neurotoxiques, les pyréthrinoïdes ciblent le **système nerveux périphérique (SNP).** Leur mode d'action, proche de celui du DDT (Jett, 2011), consiste à moduler les **canaux sodiques voltage-dépendants** de la membrane des axones (**Fig. 40**). La deltaméthrine perturbe la neurotransmission en bloquant la fermeture de ces canaux. Leur ouverture permanente conduit à une augmentation du flux d'ions Na<sup>+</sup> qui induit des hyperexcitations nerveuses, puis une dépolarisation des neurones, avec un impact résiduel sur les axones ainsi que des dommages irréversibles du système nerveux. La deltaméthrine induit d'importantes perturbations chez l'insecte, dont des convulsions qui sont rapidement fatales (Palmquist *et al.,* 2012 ; Casida & Durkin, 2013). Chez l'abeille, la deltaméthrine agit non seulement sur les canaux sodiques (Zhou *et al.,* 2011) mais également sur les **canaux calciques** voltage-dépendants de type T (Wang *et al.,* 2016).

La deltaméthrine semble avoir une faible toxicité pour les mammifères tandis qu'elle est très importante pour les insectes dont le canal sodium serait 100 fois plus sensible que celui du rat (Warmke *et al.,* 1997). Elle est considérée comme un composé à risque pour les pollinisateurs.

#### D.2.3.2. Utilisation en agriculture et en santé humaine et animale

Contrairement aux néonicotinoïdes, les pyréthrinoïdes sont des insecticides non systémiques, dont l'action est plus limitée contre les insectes piqueurs-suceurs. Leur caractère lipophile leur offre néanmoins une très bonne efficacité puisqu'ils sont moins sujets au lessivage. La faible toxicité de la deltaméthrine pour les mammifères ainsi que son efficacité à faible dose sur un spectre très large de nuisibles en ont fait une des molécules les plus utilisées, en tant qu'insecticide mais aussi en tant qu'acaricide (**Tab. VII** ; Anadón *et al.*, 2013). Comme produit phytopharmaceutique, la deltaméthrine est utilisée sur tous types de cultures. Elle est généralement appliquée par pulvérisation sur les surfaces foliaires ou bien sur les surfaces agraires avant d'être adsorbée dans le sol. Elle est présente, entre autres, dans la formulation commerciale du Decis<sup>®</sup>, qui est applicable durant les périodes de floraisons malgré un risque probable pour les pollinisateurs (catalogue E-Phy, Anses). La deltaméthrine est aussi utilisée dans la lutte contre les arthropodes vecteurs de maladies, que ce soit en élevage d'animaux

de ferme, en aquaculture (piroplasmose, leishmaniose ...) ou en santé humaine (paludisme, chikungunya, Zika, dengue...) (Balrow *et al.,* 2001 ; Bhanu *et al.,* 2011).

Moins onéreux, plus efficaces et induisant moins de phénomènes de résistance chez les insectes, les pyréthrinoïdes ont été les premières molécules à remplacer les organo-phosphorés, organochlorés ou carbamates d'ancienne génération dans les années 1970-80 (**Fig. 38**). Plus récemment, avec la diminution de l'usage des néonicotinoïdes, l'utilisation des pyréthrinoïdes en Europe reste relativement stable et a même de nouveau augmenté dans certains pays comme en Pologne (Nieradko-Iwanicka & Borzęcki, 2015 ; Sparks *et al.,* 2019).

#### D.2.4. Un phénylpyrazole : le fipronil

#### D.2.4.1. Un antagoniste des récepteurs GABAR et GluCIR

La famille des phénylpyrazoles comprend neuf substances dont la plus connue et la plus utilisée est le fipronil. Le fipronil est un antagoniste des récepteurs GABAR et GluClR. L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur qui a pour rôle d'inhiber l'activité neuronale. En se fixant sur un **récepteur ionotrope à canaux chlorures à GABA (GABAR)**, il permet l'influx d'ions Cl<sup>-</sup> dans le neurone post-synaptique, induisant une hyperpolarisation inhibitrice de l'activité neuronale (**Fig. 40**). Le fipronil inhibe ce récepteur et bloque l'entrée des ions Cl<sup>-</sup> en se fixant sur un autre site que le GABA (antagonisme non compétitif). Le fipronil est très actif chez les insectes car il bloque également le **récepteur ionotrope à canaux chlorures à glutamate (GluClR**; Narahashi *et al.,* 2010). Le fipronil induit indirectement une excitation excessive du SNC provoquant la paralysie puis la mort de l'insecte. (Gunasekara *et al.,* 2007; Casida & Durkin, 2013).

Le fipronil montre une sélectivité encore plus forte que les néonicotinoïdes pour les insectes avec une très faible toxicité pour les mammifères. En effet les mammifères possèdent un sous-type de GABAR distinct de ceux des insectes et pas de GluClR. Le fipronil s'est montré très efficace contre les insectes résistants aux classes d'insecticides d'anciennes générations. Cependant, comme il est toxique sur un très large spectre d'arthropodes, il représente un risque élevé pour les pollinisateurs (Bonmatin *et al.*, 2015).

#### D.2.4.2. Utilisations comme traitement phytopharmaceutique et vétérinaire

Le fipronil est une substance phytopharmaceutique utilisé sur cultures, notamment de céréales (**Tab. VII**), en étant parfois combinée à un fongicide (E-Phy, Anses). Il est présent en Europe depuis 1993 dans les formulations de la gamme Regent<sup>®</sup>, en application sur sol, en enrobage de semences ou en pulvérisation. L'intérêt de cette molécule, similaire à celui des néonicotinoïdes, en a fait une autre alternative aux anciens insecticides. Le fipronil possède lui aussi un caractère systémique en présence de certains adjuvants (Gunasekara *et al.,* 2007 ; Bonmatin *et al.,* 2015). Sa forte toxicité pour les insectes fait qu'il est utilisé contre de nombreuses espèces nuisibles (moustiques, criquets, puces). Il est également utilisé pour son pouvoir acaricide, notamment contre les tiques. Outre son utilisation en agriculture, c'est



**Figure 43. Les modèles d'exposition des abeilles aux insecticides** proposent que les principales voies ont lieu lors des activités de butinage. Certains insecticides sont appliqués par spray (pulvérisation) sur cultures, contaminant directement les butineuses qui sont présentes et les surfaces des plantes qu'elles visitent ensuite. Les insecticides systémiques sont généralement utilisés en enrobage de semences. Ils se retrouvent dans toute la plante y compris le nectar et le pollen. Les butineuses ramènent ainsi des matrices contaminées dans la colonie. Le tableau ci-dessous montre l'importance des voies d'exposition pour les ouvrières et les larves. Figure d'après Fischer & Moriarty (2011) et EFSA (2012). Tableau d'après Fischer & Moriarty (2011).

Exposure	Adult	Larvae	
Nectar	+++	+	
Pollen	+ to +++ <sup>1</sup>	++4	
Water	+ to +++	+5	
Nesting material	+2	+2	
Exposure to soil	_/+	-	
Foliar residues (contact and direct spray)	+++	-	
Direct spray	+++ 3	_	
<sup>1</sup> Particularly for nurse bees <sup>2</sup> Wax, e.g.	<sup>4</sup> Bee bread <sup>5</sup> Provided by nurse bees		

<sup>3</sup> At flowering

ovided by nurse bee

aussi la substance active de formulations destinées à la protection contre les ectoparasites sur animaux d'élevage ou de compagnie (par ex. Frontline<sup>®</sup>).

Le fipronil, à l'instar de certains néonicotinoïdes, est persistant dans l'environnement. De plus, sa lente dégradation produit des métabolites (fipronil-désulfinyl, fipronil-sulfure, fipronil- sulfone, fipronil-amide) dont certains sont également très persistants et fortement toxiques, contribuant à la contamination des sols et des eaux. Les études mettant en évidence des effets délétères du fipronil sur l'environnement s'accumulent, notamment sur des espèces non-cibles comme les abeilles ou des espèces de poissons (Gunasekara *et al.,* 2007). Le risque de toxicité, notamment important pour les pollinisateurs, a conduit à de nombreuses **restrictions** d'utilisation en agriculture et en élevage.

# D.3. Les voies d'exposition des abeilles aux insecticides

# D.3.1. Les abeilles sont exposées aux pesticides lors des activités de butinage

L'usage massif de pesticides dans les systèmes agricoles intensifs a conduit à la contamination des différents compartiments environnementaux avec lesquels l'abeille est en contact : air, sol, eau, plantes. Les abeilles butinant les cultures en floraison, notamment depuis des colonies volontairement installées à proximité dans un but de pollinisation ou de production de miel, sont donc très exposées à ces contaminants (**Fig. 43**, Niell *et al.*, 2017).

La **pulvérisation** d'insecticides parait être la principale voie de contamination aérienne des pollinisateurs, en les intoxiquant de façon aigüe durant les périodes de traitement. Cette méthode d'application favorise également la contamination involontaire des zones périphériques *via* un phénomène appelé dérive qui englobe la dispersion par le vent. Afin de limiter ce type de contamination, l'usage de la plupart des formulations est proscrit en période de floraison, bien que certaines formulations telles que le Decis<sup>®</sup> ou le Proteus<sup>®</sup> demeurent autorisées durant ces périodes. Certains insecticides, en particulier les insecticides systémiques, sont plutôt distribués en **enrobage** de semences. Cet usage a été considéré dans un premier temps comme minimisant les contaminations vers les populations non cibles (Ahmed *et al.,* 2001 ; Koch *et al.,* 2005). Cependant, les poussières que cela génère se sont ensuite révélées être un facteur de dispersion non négligeable (Bonmatin *et al.,* 2015).

L'abeille peut ainsi être exposée de façon aigüe à ces différentes particules aériennes et plusieurs études ont reporté des mortalités inhabituelles au sein de colonies à la suite de tels traitements (Pistorius *et al.,* 2009 ; Krupke *et al.,* 2012 ; Pistorius *et al.,* 2015). L'abeille peut par exemple être contaminée par des doses létales de néonicotinoïdes en volant à travers un nuage de poussières (Girolami *et al.,* 2012).

Pour ce qui est de la contamination des **sols**, l'application d'insecticides sous forme granulée est une voie de contamination évidente. La libération de substances par des plantes traitées de
façon systémique (par exemple par enrobage de semence) est également possible, tout comme le dépôt d'aérosols contaminés (spray, poussières). Ce type de contamination est surtout délétère pour les organismes du sol tels que les vers de terres et autres invertébrés. En revanche, la contamination des sols contribue à la pollution des eaux qui, outre les dépôts liés aux dérives lors des épandages, sont contaminées lors du lessivage des sols. Le ruissellement des insecticides inclut à la fois les particules en suspension et les substances dissoutes dans le cas de molécules relativement solubles comme les néonicotinoïdes (Bonmatin et al., 2015). Ainsi, des concentrations importantes d'insecticides sont régulièrement retrouvées dans les eaux de surfaces. À titre d'exemple, un échantillonnage effectué en Californie entre 2010 et 2011 a permis de détecter l'imidaclopride dans 89% des échantillons à des concentrations dépassant parfois le seuil toléré (Starner & Goh, 2012). Des contaminations aux insecticides, jusqu'à 1 490 ng/L de thiaméthoxame et 256 ng/L d'imidaclopride, ont été observées dans des cours d'eau au Canada entre 2012 et 2013 (Main et al., 2014). En dehors des organismes aquatiques, ces contaminations peuvent atteindre les abeilles lorsque celles-ci collectent l'eau nécessaire à leur consommation, à la transformation des ressources pour le couvain et à la thermorégulation de la ruche (Kühnholz & Seeley, 1997 ; Samson-Robert et al., 2014). Enfin, la contamination de plantes non cibles par le ruissellement en fait de potentielles sources de contamination secondaires, notamment dans le cas des insecticides systémiques.

Une des principales voies de contamination pour les abeilles reste en effet la plante traitée en elle-même. Les abeilles peuvent entrer en contact avec les insecticides déposés sur les parties aériennes du végétal mais aussi, dans le cas des **insecticides systémiques**, avec toutes les ressources butinées sur la plante. En effet, les traitements systémiques sont diffusés par le phloème et le xylème dans l'ensemble des tissus végétaux, et ce tout au long du développement de la plante. Les insecticides systémiques sont alors présents dans les produits de la plante, même en dehors des périodes de traitement (Bonmatin *et al.*, 2015). À titre d'exemple des concentrations d'imidaclopride entre 20 et 100 ng/g ont été retrouvées dans des exsudats (résine, propolis) de tournesols (Pareja *et al.*, 2011), mais aussi dans le pollen avec une moyenne de 3 ng/g (Bonmatin *et al.*, 2003). Des concentrations entre 11,1 et 81,2 ng/g de thiaclopride ont été détectées dans le nectar rapporté par les butineuses (Tanner, 2010). Sur des plants de maïs issus de semences enrobées, jusqu'à 346 mg/L d'imidaclopride et et 146 mg/L de thiaméthoxame ont été retrouvés dans les gouttelettes de guttation (Tapparo *et al.*, 2011). Sans provoquer d'exposition aigüe, les insecticides systémiques peuvent toutefois contaminer les abeilles de façon chronique (Sánchez-Bayo & Goka, 2014 ; Chagnon *et al.*, 2015).

Les butineuses sont donc directement exposées aux insecticides, par deux voies principales :

- des expositions par contact, potentiellement aigües, avec des surfaces contaminées (plantes, eau) ou des particules aériennes lors de l'épandage de graines ou de pulvérisation,
- des expositions orales via les ressources contaminées (pollen, nectar, exsudat, eau), notamment suite à un traitement systémique des plantes. Les butineuses vont alors rapporter ces ressources à la ruche, exposant l'ensemble de la colonie de façon chronique.

**Tableau VIII. Résidus insecticides dans trois matrices de colonies.** Les prévalences dans les échantillons sont données en %, les concentrations moyennes en ng/g de matrice (ppb). Les données ont été compilées à partir de données publiées obtenues en Europe, en Amérique et en Asie. Les résidus parents et leurs métabolites ont été rassemblés. nd : non déterminé. D'après Sanchez bayo & Goka (2014).

	Couma-	таа	Delta-	Einronil	Imida-	Thia-	Thiamé-
	phos	ושש	méthrine	Fiprofili	clopride	clopride	thoxame
Pollen							
Prévalence (%)	32,6	0,6	1,6	2,8	16,2	17,7	12,8
Moyenne (ng/g)	128,3	31,2	25,7	1,6	19,7	75,1	28,9
Maximum (ng/g)	5917	110	91	29	912	1002,2	127
Miel ou nectar							
Prévalence (%)	47,5	13,9	1,4	nd	21,4	64	65
Moyenne (ng/g)	105,5	44,2	4,6	nd	6	6,5	6,4
Maximum (ng/g)	2020	658	6,7	nd	72,8	208,8	17
Cire							
Prévalence (%)	67,7	2,4	2,1	1,4	4,3	4,8	7,7
Moyenne (ng/g)	1351,5	17,2	112,3	12,8	26,5	59,2	38
Maximum (ng/g)	93200	31	613	35,9	45	113	38

# D.3.2. Des acaricides sont introduits à l'intérieur des colonies

Les abeilles sont particulièrement exposées aux acaricides utilisés dans la **lutte contre** *V. destructor* et autres nuisibles de la ruche. Ceux-ci sont directement appliqués dans la colonie par l'apiculteur (**Fig. 43**). Avec le développement de *Varroa* dans le monde et les ravages qu'il cause (*cf.* A.3.2.1), cette pratique est devenue presque incontournable. Si le coumaphos est exclusivement utilisé en Amérique du Nord (*cf.* D.2.2.2), d'autres substances sont utilisées en Europe comme l'amitraz ou le tau-fluvalinate, présents respectivement dans les formulations Apivar<sup>®</sup> (Veto-Pharma) et Apistan<sup>®</sup> (Vita Europe). Certaines formulations sont également autorisées pour l'apiculture biologique comme l'Apiguard<sup>®</sup> (Vita Europe) et le Thymovar<sup>®</sup> (Andermatt BioVet) tous deux à base de thymol.

La majorité de ces formulations s'appliquent sous forme de bandelettes, généralement après la récolte et suffisamment longtemps avant la miellée suivante pour éviter la contamination du miel commercialisé. L'acaricide diffuse alors pendant plusieurs semaines. Les fortes doses appliquées ( $\geq 1$  g par application) et le caractère lipophile de ces molécules en font les premiers contaminants des matrices des colonies, en particulier des cires. Bien que ces types de traitements paraissent indispensables au maintien des colonies infestées, ils ont également montré des effets délétères sur la vitalité des colonies, notamment vis-à-vis du couvain puisque des cas de surmortalité ont été observés chez des larves exposées de façon chronique à des concentrations résiduelles de coumaphos (8 mg/L) mais aussi de tau-fluvalinate (3 mg/L) dans la nourriture (Zhu *et al.*, 2014).

# D.3.3. Les insecticides se retrouvent dans les matrices de la colonie

La contamination des matrices de la ruche par des résidus insecticides ou acaricides a été mise en évidence par de très nombreuses études, principalement fondées sur des analyses par chromatographie (voir par exemple Chauzat *et al.*, 2009 ; 2011 ; Mullin *et al.*, 2010 ; Krupke *et al.*, 2012 ; Lambert *et al.*, 2013). Ces résidus sont retrouvés dans le pollen et le nectar récoltés par les butineuses mais aussi des dans la cire, le miel, le pain d'abeille, la propolis et enfin dans les abeilles elles-mêmes. Les taux de contamination sont variables mais les analyses montrent que les ruchers sont rarement exempts d'insecticides (**Tab. VIII**). Sanchez-Bayo & Goka (2014) ont compilé un grand nombre d'études réalisées sur l'ensemble des continents pour quantifier ces résidus dans les matrices. Ces données montrent une contamination par de nombreux pesticides, majoritairement des herbicides et des fongicides, mais également par une grande diversité d'insecticides.

Cent vingt-quatre pesticides ont été détectés dans les données compilées sur **le pollen** (Sanchez-Bayo & Goka, 2014), dont la moitié avec une fréquence supérieure à 2%. Vingt insecticides ont été retrouvés dans plus de 10% des échantillons dont trois néonicotinoïdes : le thiaclopride (17,7%), l'imidaclopride (16,2%) et le thiaméthoxame (12,8%), avec des concentrations moyennes entre 19 et 75 ng/g mais parfois supérieures à 1000 ng/g. La

deltaméthrine et le fipronil ont des prévalences moindres mais non négligeables (respectivement 1,6 et 2,8 %) avec des concentrations moyennes de 25,7 ng/g et 1,6 ng/g. Le coumaphos est la substance la plus retrouvée dans les pollens (32,6% des échantillons) avec une concentration moyenne de 128 ng/g et des pics de contamination allant jusqu'à 5,9 µg/g.

Dans les échantillons de **miel,** 77 molécules ont été détectées, généralement à des concentrations plus faibles que dans les autres matrices. Il s'agit majoritairement de néonicotinoïdes systémiques, le thiaclopride et le thiaméthoxame étant les deux substances les plus souvent retrouvées (64 à 65%) à des concentrations moyennes de 6 à 6,5 ng/g. La présence du coumaphos reste néanmoins importante (47,5%). C'est dans les échantillons de **cire** que les acaricides ont été retrouvés le plus fréquemment (67,7% pour le coumaphos) et que les concentrations les plus fortes de pesticides ont été détectées, notamment pour le coumaphos retrouvé en moyenne à 1,35 µg/g avec des pics allant jusqu'à 93,2 µg/g.

Concernant les résidus retrouvés dans **l'abeille**, une étude conduite en France entre 2002 et 2005 sur 125 colonies avait mis en évidence la présence d'imidaclopride (> 1 ng/g en moyenne) dans plus d'un quart des échantillons (Chauzat *et al.,* 2009). Des résidus de coumaphos (1,5  $\mu$ g/g), de deltaméthrine (16,9 ng/g) et de fipronil (0,5 ng/g) ont également été retrouvés sur un nombre plus faible d'échantillons (respectivement 4,6, 5,9 et 9,1%).

L'ensemble de ces données montre que les acaricides, dont le coumaphos, sont les substances retrouvées le plus souvent et aux plus fortes concentrations car directement appliquées dans les colonies. Le thiaclopride est l'un des néonicotinoïdes les plus fréquemment retrouvé.

Ces contaminations varient selon le **contexte paysager**, le contexte saisonnier et les pratiques agricoles (Lambert *et al.*, 2013 ; Boyle & Sheppard, 2017). Lambert *et al.* (2013) ont observé des taux de contamination plus élevés dans les ruchers situés à proximité des grandes cultures, notamment au printemps, qui correspond à la période de traitement la plus importante, et au début de la saison apicole, avec l'intensification des activités de butinage. Certaines substances seraient plus abondantes autour de cultures nécessitant un traitement spécifique. Pareja *et al.* (2011) ont ainsi observé de fortes concentrations de fipronil dans des ruchers proches de cultures de soja et de fortes concentrations d'imidaclopride dans des colonies situées à proximité de cultures de tournesol.

# D.3.4. Toutes les abeilles de la colonie sont exposées de manière chronique

En dehors de l'exposition des butineuses à l'extérieur de la colonie, la contamination des ressources récoltées, mais aussi l'apport d'intrants (acaricides) par l'apiculteur lui-même, conduisent ces substances à contaminer l'ensemble des matrices de la colonie. L'ensemble de la la colonie est alors exposé à ces résidus de manière chronique, que ce soit par voie de contact (avec les matrices contaminées) ou orale (ingestion de ressources contaminées). Tous les individus de la colonie peuvent ainsi être exposés : larves (nourries de pollen et de gelée royale), ouvrières, mâles, reine (Morales *et al.,* 2020). Ce constat a amené à considérer

certaines substances comme étant à risque, bien que présentes à faible concentrations, du fait de leur présence continue dans les matrices et de leur forte toxicité. L'évaluation des risques liés à ce type d'exposition, notamment orale, classe ainsi les insecticides systémiques, en particulier les néonicotinoïdes, comme les substances les plus à risque pour l'abeille (Sanchez-Bayo & Goka, 2014).

# D.4. Les impacts des insecticides sur l'abeille

La préoccupation des scientifiques, des organisations apicoles et des pouvoirs publics, vis-àvis de la problématique des pesticides est illustrée par le nombre croissant de publications étudiant l'impact de ces derniers sur les pollinisateurs, en particulier sur l'abeille (Thompson, 2003 ; Osborne, 2012 ; Pisa *et al.*, 2017). Si les premières études se sont surtout concentrées sur leur toxicité et leurs effets sur le comportement des abeilles, les approches moléculaires et histologiques ont montré d'autres impacts, notamment ceux induits par de faibles doses.

Afin d'étudier les impacts des insecticides sur l'abeille quelques études ont porté sur des colonies en conditions semi-naturelles, notamment pour analyser le comportement des abeilles. Pour observer des effets physiologiques sur des petits groupes d'abeilles plus facilement manipulables, deux approches expérimentales sont couramment utilisées :

- Une application aigüe par voie de contact (pulvérisation ou dépôt d'une goutte sur le thorax) ou orale (ingestion d'une petite quantité de sirop de saccharose contaminé) afin de mimer une exposition unique des butineuses à l'extérieur de la colonie. On essaie alors d'utiliser des doses environnementales qui correspondent, par exemple, à ce que les abeilles peuvent recevoir lors d'un vol de butinage au cours d'un épandage.
- Une application orale chronique, qui sera notée "OC" par la suite, en contaminant une source de nourriture avec des doses d'insecticides (indiquée en masse par masse de sirop de saccharose, sauf indication contraire) que l'on retrouve dans les matrices afin de mimer au mieux l'exposition chronique à l'intérieur de la colonie.

# D.4.1. Des altérations physiologiques

Les insecticides ont un impact sur l'activité métabolique des abeilles, en particulier sur les mécanismes d'immunité et de détoxication. Ils induisent également des dommages cellulaires et une attention particulière sera apportée à l'intestin moyen.

#### D.4.1.1. L'activité acétylcholinestérase dans la tête

L'abeille mellifère produit deux acétylcholinestérases (AChE ; Belzunces *et al.,* 1988 ; Kim *et al.,* 2012). L'AChE1, soluble, est trouvée un peu partout dans l'organisme, dans des tissus du système nerveux périphérique ou non nerveux. L'AChE2, plus active sur l'ACh et ancrée dans la membrane cellulaire, est localisée au niveau du SNC. Elle est responsable de la dégradation postsynaptique de l'ACh et c'est la cible des insecticides organophosphorés (**Fig. 40**). Le

coumaphos est un inhibiteur de l'AChE (Williamson *et al.,* 2013), et pourtant il ne réduit pas l'activité AChE dans les têtes en application topique (100  $\mu$ g/ab ; Weick & Thorn, 2002). En revanche, une exposition orale active l'expression du gène codant l'AChE2, mais pas l'AChE1, dans le cerveau et dans l'intestin moyen (Williamson *et al.,* 2013).

Les néonicotinoïdes, qui bloquent les récepteurs de l'ACh, modifient eux aussi l'activité AChE. Cette réponse semble complexe, variant avec la dose, la molécule et le mode d'application. Par exemple une exposition OC à de faibles doses d'imidaclopride (0,08-0,24 ng/ab) induit une augmentation de l'activité AChE après 10 j (Boily *et al.*, 2013) alors qu'une exposition orale aigüe à une forte dose (4,3 ng/ab) induit une diminution après 48h (Li *et al.*, 2017b).

L'activité AChE semble aussi modulée par les insecticides non associés à l'ACh. Elle est réprimée en réponse à un traitement sublétal au fipronil chez le faux bourdon (Kairo *et al.,* 2017), bien que cela n'ait pas été observé chez l'ouvrière par Roat *et al.* (2017). L'activité AChE semble également modulée par la deltaméthrine (Badiou *et al.,* 2008). L'activité AChE apparait donc comme un **marqueur de la réponse du SNC** aux neurotoxiques.

# D.4.1.2. L'expression de gènes de détoxication

Les capacités détoxifiantes dont dispose l'abeille (*cf.* B.4.1), participent à la métabolisation des insecticides absorbés. Des approches transcriptomiques par RT-QPCR, puces à ADN ou RNA-seq ont montré des modifications de l'expression de gènes codant des enzymes de détoxication comme les CYP, des GST ou des enzymes antioxydantes.

Des études sur des abeilles entières ont montré, par exemple, des modulations d'expression en réponse au coumaphos pour CYP306A1 (dès 5 ng/g OC), CYP6AS3, CYP6AS4 et CYP9S1 (100 ng/g OC), à la deltaméthrine pour CYP9Q2 (0,53 ng/ab), à l'imidaclopride et au thiaméthoxame pour CYP4G11 (Boncristiani *et al.*, 2012 ; Schmehl *et al.*, 2014 ; Christen *et al.*, 2019 ; De Smet *et al.*, 2017 ; Tesovnik *et al.*, 2020). Le coumaphos et le thiaméthoxame modulent aussi l'expression de la protéine kinase cAMP-dépendante.

Les insecticides régulent enfin l'expression de gènes codant des enzymes antioxydantes avec une catalase (coumaphos, imidaclopride) une superoxide dismutase (SOD) et une thiorédoxine péroxidase (coumaphos), une thiorédoxine réductase et la méthionine sulphoxyde réductase A (imidalopride) (Chaimanee *et al.,* 2016 ; Gregorc *et al.,* 2018). Au niveau protéique, la quantité de thiorédoxine réductase 1 est également induite par le fipronil (10 pg/ab/j OC ; Roat *et al.,* 2014).

De telles modulations de l'expression de gènes codant des CYP ou des enzymes antioxydantes ont aussi été observées chez les larves et les reines en présence de coumaphos ou d'imidaclopride (Derecka *et al.,* 2013 ; Cizelj *et al.,* 2016 ; Chaimanee *et al.,* 2016 ; Wu *et al.,* 2017).

# D.4.1.3. L'immunité de l'abeille

La réponse **immunitaire humorale** est surtout connue à travers l'étude de l'expression de gènes. Une exposition au coumaphos modifie l'expression de nombreux gènes (Schmehl *et al.*, 2014), dont une diminution de l'expression du lysozyme (333 ng/g OC ; Garrido *et al.*, 2016), des gènes basket (JNK MAP kinase) et de la Vg (traitement CheckMite+<sup>®</sup> ; Boncristiani *et al.*, 2012). En revanche, aucune réponse des gènes AMP à une exposition aigüe (LC<sub>50</sub>) de coumaphos n'a été observée (Garrido *et al.*, 2013). Le fipronil et l'imidaclopride (46 et 45 ng/ab/j OC) induisent la répression des gènes codant le lyzozyme 1, l'hyménoptaecine et la glucose dehydrogénase (ou GMX oxydoréductase), aux propriétés antimicrobiennes (Aufauvre *et al.*, 2014). Au niveau protéique, la défensine est également induite par le fipronil (10 pg/ab/j OC ; Roat *et al.*, 2014). Le thiaméthoxame (10 ng/g OC) module aussi l'expression de gènes AMP, avec par exemple une inhibition de l'abaecine (Collison *et al.*, 2018). Pour autant, cet insecticide ainsi que l'imidaclopride (102 ng/g OC), n'induit pas de changement dans l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe sur la bactérie *Micrococcus lycodeikticus*, suggérant qu'il faut rester prudent dans l'interprétation des données transcriptomiques sur la réponse immunitaire (Collison *et al.*, 2018).

Les insecticides modulent aussi l'expression de gènes de l'immunité chez les larves, comme le coumaphos et le thiaméthoxame, avec des gènes d'AMP ou de signalisation, ou l'imidaclopride (Cizelj *et al.,* 2016; Chaimanee *et al.,* 2016 ; Tesovnik *et al.,* 2020 ; Wu *et al.,* 2017). Il en est de même chez les reines, avec une répression de l'apidaecine et de LRR (qui régulerait NFκB) en réponse à l'imidaclopride (20 ng/g) et au coumaphos (5 μg/g ; Chaimanee *et al.,* 2016).

L'action des insecticides sur l'**immunité cellulaire** semble plus réduite, à moins qu'elle ne soit moins étudiée. Une exposition orale au thiaclopride réduit, chez de jeunes reines, le nombre d'hémocytes et l'activité antimicrobienne dans l'hémolymphe, ainsi que l'encapsulation de particules exogènes (Brandt *et al.,* 2017). Chez des larves exposées à l'imidaclopride, le niveau de phagocytose diminue dans l'hémolymphe (Walderdorff *et al.,* 2018). Pour Boncristiani *et al.* (2012), le coumaphos réprime l'expression du gène dscam qui, selon les auteurs, serait associé à la quantité d'hémocytes dans l'hémolymphe.

Les insecticides modulent donc l'expression de gènes de l'immunité et le niveau d'hémocytes dans un sens qui semble plutôt inhibiteur, suggérant une **immunosuppression**. Celle-ci pourrait alors sensibiliser les abeilles aux pathogènes, rendant les combinaisons insecticides-pathogènes particulièrement néfastes pour les abeilles (O'Neal *et al.*, 2018).

# D.4.2. Une dégénérescence cellulaire dans l'intestin moyen et d'autres organes

La présence de résidus d'insecticides dans les matrices de la ruche suggère une exposition des abeilles tout au long de leur développement. Des altérations morphologiques caractéristiques des processus d'apoptose et de nécrose ont été observées dans l'**intestin moyen** aux stades larvaire et adulte d'ouvrières intoxiquées.

Après 6 jours d'exposition au fipronil (1  $\mu$ g/g OC) les cellules épithéliales de l'intestin moyen de larves présentent une forte vacuolisation, des organites fragmentés et des noyaux picnotiques caractéristiques des cellules apoptotiques, ainsi que la présence de cellules détachées dans la lumière intestinale (da Silva Cruz *et al.*, 2010). L'imidaclopride (400 ng/g OC) et le coumaphos (100 ng/g OC) induisent également une augmentation de la mortalité des cellules épithéliales chez les larves (Gregorc & Ellis, 2011).

Chez l'abeille adulte, une intoxication au thiaméthoxame (0,42ng/L/j OC) aurait aussi un effet cytotoxique au niveau de l'intestin moyen. Une altération des organites des cellules digestives a été observée dès le premier jour de traitement mais une exposition sur 5 j a cependant conduit à une régénération du tissu intestinal (Catae *et al.,* 2014). L'observation au microscope électronique à balayage d'intestins moyens d'abeilles exposées à la deltaméthrine (2,5 ng/g OC) a mis en évidence une lumière intestinale encombrée, avec une altération de la couche épithéliale externe qui présentait des cellules contiguës et une diminution des cryptes, ainsi qu'une perturbation cellulaire au niveau de la couche basale de l'épithélium (Aljedani *et al.,* 2017). L'imidaclopride (5 et 20 ng/g OC) et le coumaphos (96,6 µg/g OC) induiraient aussi une cytotoxicité sur les cellules épithéliales, augmentant le nombre de cellules apoptotiques et induisant d'importants dommages tissulaires (Gregorc *et al.,* 2018). L'ensemble de ces dommages induits par les insecticides, comme la disparition des cryptes formées par les cellules épithéliales (**Fig. 16**), induirait une altération de l'intégrité du tissu et donc de ses capacités protectrices et digestives (Aljedani *et al.,* 2017).

Les insecticides affectent d'**autres tissus** chez l'abeille. Le thiaméthoxame aurait un effet cytotoxique au niveau des tubes de Malpighi (Catae *et al.*, 2014). L'imidaclopride et le coumaphos peuvent avoir un impact sur la morphologie des glandes hypopharyngiennes, impliquées dans la production de gelée royale, dont la taille serait réduite en comparaison avec les abeilles non traitées (Gregorc *et al.*, 2018). Ces observations pourraient être liées à une nécrose des tissus ainsi qu'à une augmentation de l'expression de protéines HSP70 et 90 (heat shock protein) induisant la mort cellulaire (Skerl & Gregorc, 2010). Enfin, le fipronil augmenterait le nombre de cellules apoptotiques dans les glandes salivaires et les ovaires des larves (Gregorc & Ellis, 2011).

# **D.4.3.** Des altérations comportementales

#### D.4.3.1. Une hyperstimulation musculaire affectant les capacités motrices

Il est généralement considéré que l'application aigüe des insecticides neurotoxiques déclenche une hyperstimulation du SNC conduisant de la paralysie à la mort, en passant par une hyperstimulation musculaire pouvant aussi être observées lors d'intoxications sublétales.

Une exposition orale aigüe d'ouvrières au coumaphos (3,6 à 363 ng/g) a causé des perturbations motrices, avec une augmentation des spasmes abdominaux, des gestes de toilettage et des troubles de l'équilibre traduite par des renversements plus fréquents



Figure 44. Répartition du temps d'activité d'abeilles exposées au coumaphos. Des abeilles ( $n\geq 23$ ) ont été nourries pendant 24h avec du sucrose seul (en noir) ou contaminé avec 10 nM de coumaphos (en hachuré). Les activités ont été réparties (de gauche à droite) à marcher, être renversée, avoir des spasmes abdominaux, se toiletter, voler, ou rester immobile. D'après Williamson *et al.* (2013).

(Fig. 44 ; Williamson *et al.*, 2013). De tels effets ont également été observés lors d'expositions chronique sublétales par Aliouane *et al.* (2009) mais pas El Hassani *et al.* (2005). Les premiers ont décrit des altérations des fonctions locomotrices avec de longues périodes d'immobilité, après 11 jours d'intoxication au fipronil (0,01 ng/ab OC), qui pourraient être la conséquence de difficultés de coordination ou de contraction des muscles (Belzunces *et al.*, 2012).

## D.4.3.2. Des capacités cognitives altérées

En affectant le SNC, les insecticides induisent des altérations cognitives, notamment les néonicotinoïdes fixant les récepteurs nAChR qui joueraient un rôle important dans les capacités cognitives (Taillebois *et al.*, 2018). Les capacités associées aux processus olfactifs et visuels, fortement liées aux mécanismes de transmission neuronale, sont étudiées en observant l'apparition ou non d'un PER (**Fig. 35**; Guez *et al.*, 2001; Belzunces *et al.*, 2012).

Certains insecticides peuvent affecter la **sensibilité au saccharose**. Une exposition orale aigüe à l'imidaclopride (0,21 et 2,16 ng/ab) et aigüe par contact au fipronil (1 ng/ab) induisent une réponse plus faible (% PER) pour une même concentration de saccharose (El Hassani *et al.,* 2005 ; Eiri & Nieh, 2012).

Les insecticides peuvent aussi altérer la **spécificité de la réponse olfactive**. Une intoxication OC au fipronil (0,01 ng/ab/j) a par exemple inhibé les capacités des abeilles à discerner des odeurs familières et inconnues (Aliouane *et al.,* 2009). Des résultats similaires avaient été obtenus à la suite d'une intoxication à l'imidaclopride (500 ng/g, OC ; Decourtye *et al.,* 2004).

Les impacts sur les capacités d'**apprentissage** et de **mémoire** ont été plus largement étudiés. L'altération de ces capacités a été démontrée chez l'ouvrière pour la deltaméthrine en exposition OC (30 ng/ab/j et 500 ng/g) (Decourtye *et al.*, 2005a ; Ramirez-Romero *et al.*, 2005), pour le fipronil en OC (0,15 ng/ab/j), orale aigüe et de contact aigüe (0,5 ng/ab ; Decourtye *et al.*, 2005a ; El Hassani *et al.*, 2005 ; Bernadou *et al.*, 2009), pour l'imidaclopride en OC (dès 24 ng/g) avec un effet plus important chez les abeilles d'été que chez les abeilles d'hiver (Decourtye *et al.*, 2003,2004 ; Ramirez-Romero *et al.*, 2005 ; Williamson & Wright, 2013 ), pour le thiaméthoxame en OC (dès 1 ng/ab/j OC) (Aliouane *et al.*, 2009) et pour le coumaphos en OC (33 ng/g) (Siede *et al.*, 2017). Il s'agit donc là d'un impact commun aux différents insecticides, quel que soit leur mode d'action. Il y a toutefois des variations entre substances, doses et mode d'application. Par exemple les métabolites des insecticides pourraient différemment affecter la cognition. Guez *et al.* (2001, 2003) ont montré que l'altération du phénomène d'habituation après une application d'imidaclopride sur le thorax des abeilles était plutôt induite par ses métabolites imidaclopride-oléfine et 5-hydroxy-imidaclopride.

Ces tests sont généralement réalisés en laboratoire et peu d'études de terrain ont observé ces paramètres sur des colonies. Ramirez-Romero *et al.* (2005) ont validé les résultats de Decourtye *et al.* (2005) par des expérimentations en conditions semi-naturelles avec la



**Figure 45. Activité de butinage d'abeilles exposées aux insecticides.** Des abeilles ont été exposées oralement à l'imidaclopride **(A)** ou à la deltaméthrine **(B)** sur un nourrisseur floral artificiel. Les valeurs moyennes sont indiquées avec les écarts-types. En blanc : visite avant traitement (nourrissage au sucrose), en noir : période de traitement (sucrose additionné d'imidaclopride à 24 ng/g ou de deltaméthrine à 500 ng/g), en gris : période après traitement (sucrose seul). Decourtye *et al.* (2004).

deltaméthrine, tandis que l'impact d'acaricides sur l'apprentissage a également été étudié sur des ruchers, sans montrer d'effet significatifs du coumaphos (Berry *et al.*, 2013).

Les activités de butinage des abeilles sont très dépendantes de leurs capacités cognitives et motrices, que ce soit pour la détection et la localisation des ressources, la capacité à effectuer les trajets allers/retours ou la communication des informations entre butineuses. Ramirez-Romero *et al.* (2005) suggèrent ainsi un lien entre les capacités olfactives et le retour à la ruche des butineuses.

#### D.4.3.3. Une diminution de l'activité de butinage

Des colonies maintenues en conditions semi-naturelles sous tunnels ont montré une diminution de l'activité de butinage lorsqu'elles consommaient du sirop de saccharose contaminé par de la deltaméthrine (24 ng/g OC) ou de l'imidaclopride (500 ng/g OC), avec une baisse du nombre de sorties effectuées et une baisse du nombre de fleurs visitées. Avec l'imidaclopride, le nombre moyen de sorties des butineuses a diminué de moitié pendant la période de traitement et cette baisse a perduré plusieurs jours après la fin du traitement (Fig. 45; Decourtye et al., 2004). L'utilisation de puces RFID (radio-identification) sur des butineuses exposées oralement à des doses sublétales aigüe d'imidaclopride a montré une baisse de 25% des **retours à la ruche** chez les abeilles intoxiquées à 6 ng/ab et un allongement du temps de vol moyen entre la ruche et le site de butinage avec des doses de 1,5 à 3 ng/ab (Schneider et al., 2012). D'autres travaux ont également montré l'impact d'expositions chroniques à la deltaméthrine et à l'imidaclopride sur l'activité de butinage (Colin et al., 2004 ; Ramirez-Romero et al., 2005 ; Wu-Smart & Spivak, 2016). Une exposition orale au fipronil (0,3 ng/ab en une prise ou avec des nuclei exposés à une nourriture contaminée à 2 ng/g OC) perturbe tout autant l'activité des butineuses à travers une diminution du nombre de sorties et une augmentation du temps de vol (Colin *et al.,* 2004 ; Decourtye *et al.,* 2011).

#### D.4.3.4. Une perturbation de l'orientation et de la navigation des butineuses

Un traitement chronique oral à l'imidaclopride (48 ng/g OC) a induit un effet négatif sur l'interprétation visuelle et sur les capacités d'orientation des abeilles en laboratoire (Han *et al.*, 2010). En milieu naturel, le suivi des déplacements d'abeilles intoxiquées oralement avec une unique dose sublétale d'imidaclopride (7,5 et 11,25 ng/ab), de thiaclopride (1,25 µg/ab) et de clothianidine (2,5 ng/ab), a mis en évidence des perturbations de la mémoire de navigation et de l'orientation (Fischer *et al.*, 2014, voir aussi Tison *et al.*, 2016). Par exemple, le vol exploratoire jusqu'à un site de ressources a montré des trajets plus longs chez les abeilles traitées avec l'imidaclopride (11,25 ng/ab) et le thiaclopride. Le vol de retour a été affecté par les trois substances, avec une augmentation de la longueur et des temps de trajets et une diminution du nombre d'abeilles retournant à la colonie. La deltaméthrine en application par contact (2,5 ng/ab) et le fipronil administré de façon chronique *via* la nourriture (1 ng/g OC) ont eux aussi induit une diminution des capacités d'orientation des abeilles (Vandame *et al.*, 1995 ; Decourtye *et al.*, 2009).

#### D.4.3.5. Une communication moins précise : la danse des abeilles

La danse des abeilles est essentielle pour qu'une éclaireuse ou une butineuse communique aux autres butineuses la localisation d'un site de ressources. L'imidaclopride (0,21 ng/ab, intoxication orale aigüe) induit une diminution du nombre de circuits complets réalisés pendant la danse (Eiri & Nieh, 2012). Une dose sublétale de deltaméthrine (235 ng/g orale aigüe) provoque également des modifications significatives dans la réalisation de la chorégraphie (Zhang *et al.*, 2019). Une perturbation dans la réalisation de la danse des abeilles peut induire des confusions par les congénères dans l'interprétation du message (appréciation de la direction et de la distance à parcourir) et avoir des conséquences sur les capacités de la colonie à localiser un site d'intérêt.

Les altérations des capacités d'apprentissage et de mémoire par les insecticides auraient donc à la fois des conséquences sur les capacités de navigation, d'orientation, de communication des butineuses, et à plus grande échelle sur la capacité de la colonie à localiser et exploiter les ressources.

#### D.4.3.6. Des comportements altérés chez les abeilles d'intérieur

Le comportement des butineuses ne semble pas être le seul altéré par les insecticides. Des fonctions dépendantes de l'activité musculaire semblent aussi être impactées chez les abeilles d'intérieur comme la **thermogénèse**. La thermogénèse, qui est permise par la contraction des muscles alaires, est indispensable au maintien de la température de la colonie (*cf.* B.1 ; Belzunces *et al.*, 2012). La thermogénèse semble être perturbée par une intoxication à des doses sublétales de deltaméthrine, qui induisent une hypothermie sur les quatre heures suivant l'exposition (Vandame & Belzunces, 1998). Une perturbation de la thermorégulation dans une colonie exposée même à faibles doses pourrait avoir un impact dans sa capacité à passer l'hiver.

Chez des colonies d'abeilles exposées à des doses de 10 à 100 ng/g OC d'imidaclopride Wu-Smart & Spivak (2016) ont observé, outre une perturbation de l'activité des butineuses, une diminution de l'**activité hygiénique** des abeilles d'intérieur et une perturbation des fonctions locomotrices des reines. Le transfert de nourriture par **trophallaxie** semble lui aussi être réduit chez les abeilles intoxiquées au coumaphos (5 µg/ab en exposition orale aigüe ; Bevk *et al.*, 2012). Enfin, une perturbation du comportement des **nourrices** a été observé à la suite d'intoxications chroniques à la clothianidine (10 ng/g OC) et au thiaclopride (200 ng/g OC), avec une diminution des échanges de nourriture avec les larves (Siefert *et al.*, 2020). De telles altérations du comportement du couvain est un des éléments essentiels des colonies saines.

# D.4.4. Le renouvellement de la population de la colonie

La résilience de la colonie est dépendante de sa capacité à engendrer de nouvelles générations d'ouvrières pour compenser les pertes subies. Cette capacité est associée au bon développement des abeilles mais aussi à l'activité et à la fécondité de la reine (Decourtye & Devillers, 2010).

### D.4.4.1. Une diminution de la fertilité des castes reproductrices

Des doses sublétales de deltaméthrine administrées dans des colonies (20 mg/L de sirop de saccharose OC) ou directement aux reines (100 ng tous les 5 jours) ont montré un impact très significatif sur la fréquence de ponte des reines mais aussi le taux d'éclosion ou le développement des ouvrières (Dai *et al.,* 2010). L'imidaclopride (10 ng/g OC) et un mélange de thiaméthoxame et clothianidine (4 et 1 ng/g OC) induisent aussi une diminution du nombre de pontes (Williams *et al.,* 2015 ; Wu-Smart & Spivak, 2016). Celle-ci s'accompagne à plus long terme d'une diminution du couvain.

Afin de comprendre la manière dont ces molécules impactent le taux de ponte, la morphologie des ovaires ainsi que la viabilité et la quantité des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque ont été étudiées. La viabilité des spermatozoïdes diminuerait de 50 % après 7 jours de traitement à des doses sublétales d'imidaclopride (20 ng/g en application topique aigüe) alors qu'elle ne serait pas significativement affectée par le coumaphos à 100  $\mu$ g/g (Chaimanee *et al.,* 2016). Le mélange thiaméthoxame/clothianidine induit une baisse de la viabilité et de la quantité des spermatozoïdes stockés chez les reines sans affecter leur mortalité (Williams *et al.,* 2015). Il induit également une augmentation de la taille de leurs ovaires. La fertilité des mâles peut elle-même être affectée. Le fipronil induit, en laboratoire et en conditions semi-naturelles, une baisse de la quantité et de la viabilité des spermatozoïdes (Kairo *et al.,* 2017).

# D.4.4.2. Un développement retardé

Les **larves d'ouvrières** montrent un retard de développement, avec une émergence tardive des imagos, lorsque leur nourriture est contaminée à l'imidaclopride (5 ng/g, OC ; Decourtye *et al.*, 2005b). De même, des cadres de couvains de colonies exposées à la clothianidine (100 ng/g OC) et au thiaclopride (8,8  $\mu$ g/g OC) ont montré un retard de développement des ouvrières, en particulier lors des stades larvaires non operculés et durant le stade nymphal (Siefert *et al.*, 2020). Toutefois, Dai *et al.* (2018) n'ont pas observé de tels effets avec des doses pourtant bien plus élevées d'imidaclopride et de clothianidine. La deltaméthrine réduit, elle aussi, le succès de développement des ouvrières, avec une réduction des taux de d'éclosion, d'operculation et d'émergence des imagos (Dai *et al.*, 2010).

Ces effets s'accompagnent de changements dans le transcriptome des larves, avec la modulation de l'expression de gènes liés au développement (microRNA *mir-14* et HSP90) en réponse à l'imidaclopride (Derecka *et al.,* 2013). Des hypothèses suggèrent également que

ces altérations seraient liées aux perturbations comportementales des nourrices dans les soins apportés aux larves (temps consacré, trophallaxie, *cf.* D.4.2.6) mais aussi peut-être à une diminution de la quantité et de la qualité du nourrissage avec la gelée royale qui pourrait être appauvrie en ACh chez les nourrices contaminées (Zaluski *et al.,* 2017 ; Gregorc *et al.,* 2018 ; Grünewald & Siefert, 2019). En effet, les néonicotinoïdes altèrent les glandes hypopharyngiennes chez les nourrices et induisent à une diminution d'ACh dans la nourriture du couvain. Or une diminution de l'ACh aurait un impact sur le développement des larves (Grünewald & Siefert, 2019).

Le développement des **reines** peut lui aussi être affecté. Suite à une exposition au coumaphos durant le stade larvaire (100 à 1000  $\mu$ g/g dans les cires de cellules royales), une surmortalité des larves et une diminution du poids des reines ont été observées chez les individus traités (Pettis *et al.,* 2004).

# D.4.5. Mortalités induites et importance dans les pertes de colonies

# D.4.5.1. De faibles doses chroniques diminuent la longévité de l'abeille en laboratoire

L'évaluation de la toxicité des insecticides par la détermination de la LD<sub>50</sub> (**Fig. 41**) représente l'évaluation d'une toxicité aigüe, c'est-à-dire une exposition unique à des doses élevées engendrant une mortalité mesurable après 24 ou 48 h. Des doses faibles et inférieures aux doses recommandées peuvent cependant aussi induire une surmortalité à plus long terme (Laurino *et al.,* 2011).

En reprenant les données de Decourtye *et al.* (2005), on observe après 11 jours d'exposition orale chronique au fipronil à 9 ; 4,5 et 2,2  $\mu$ g/L de sirop de saccharose, une mortalité de 91%, 86% et 36% respectivement, alors que les ingestions cumulées de fipronil (0,3 ng/ab/j OC pour la forte dose) sont de l'ordre de un-demi, 1:20<sup>e</sup> et 1:200<sup>e</sup> de la LD<sub>50</sub>. Une mortalité de 100% a été observée en une semaine suite à une exposition chronique, orale ou topique, à 0,1 ng/ab/j (Aliouane *et al.*, 2009). La deltaméthrine diminue aussi la longévité de l'abeille dès 1 ng/g OC (Aljedani & Almehmadi, 2016, voir aussi Decourtye *et al.*, 2004) et une dose de 2,5 ng/g OC induit 50% de mortalité après 72h (Aljedani *et al.*, 2017). Des expositions aux néonicotinoïdes bien inférieures à leurs LD<sub>50</sub> induisent également des mortalités (Suchail *et al.*, 2001 ; Alaux *et al.*, 2010 ; Decourtye & Devillers, 2010 ; Raymann *et al.*, 2018). Les concentrations létales en exposition chronique peuvent cependant varier selon que l'exposition est orale ou de contact (Suchail *et al.*, 2001 ; Laurino *et al.*, 2011). Le coumaphos, peu toxique sur les abeilles induirait cependant une surmortalité des larves (à 8 mg/L OC ; Zhu *et al.*, 2014).

Si les insecticides induisent une hausse de mortalité en condition de laboratoire à des doses bien inférieures aux doses recommandées (Laurino *et al.,* 2011), il est beaucoup plus difficile d'évaluer leur impact en milieu naturel.



Figure 46. Mortalité d'abeilles devant des colonies exposées à un traitement insecticide. Trois sites, comportant chacun 4 colonies, ont été exposés à des poussières produites à partir de semences traitées au Poncho<sup>®</sup> (s.a. clothianidine). Les abeilles mortes ont été collectées à l'entrée ou devant les ruches puis comptées. C : site contrôle non traité, T1 : site traité avec 0.25 g s.a./ha, T2 : site traité avec 1 g s.a./ha. D'après Pistorius *et al.* (2015).

#### D.4.5.2. Mortalités et effondrements à l'échelle de la colonie

Une application par pulvérisation peut conduire à une exposition par contact aigüe, se traduisant par la mort des butineuses dans la zone traitée ou près de l'entrée de la colonie, un signe considéré comme caractéristique d'une intoxication (Colin, 1999). Les toxiques peuvent entre outre pénétrer la colonie avec les abeilles survivantes. Si la colonie est sévèrement affectée, sa désorganisation peut conduire à son effondrement. Les intoxications chroniques affectent la colonie de manière plus complexe, comme détaillé précédemment.

Quelques expérimentations ont été menées sur des expositions aigües. Un traitement conventionnel par pulvérisation à la clothianidine, dérivée du thiaméthoxame, réalisé à plus de 4 km des colonies a induit des mortalités bien observables dans les cinq jours suivants (**Fig. 46** ; Pistorius *et al.*, 2015). Stanley *et al.* (2015) ont appliqué des insecticides aux doses recommandées sur des plants de moutarde en fleurs, puis ont récupéré des butineuses après leur visite et les ont maintenues en cagette pendant 48 h. Une mortalité des butineuses a été observée en réponse aux insecticides, dont l'imidaclopride, le thiaméthoxame et surtout la deltaméthrine (100% de mortalité après 24 h).

Une exposition chronique de colonies pendant 13 semaines à l'imidaclopride ou à la clothianidine, avec une consommation d'insecticides estimée à 0,74 ng/ab/j, a induit un abandon de colonie par une majorité des abeilles au cours de l'hiver suivant et une perte de colonies dans l'année qui a suivi (Lu *et al.*, 2014). Une expérimentation similaire a confirmé une moindre capacité des colonies à passer l'hiver dans les années suivant un traitement similaire à l'imidaclopride (Dively *et al.*, 2015). Une exposition d'environ un mois et demi à un mélange de thiaméthoxame et de clothianidine (5 et 2 ng/g OC) a induit une première phase de dépopulation, avec une diminution du nombre d'ouvrières et du couvain, ainsi qu'une diminution des réserves, suivie par une seconde phase de recouvrement (Sandrock *et al.*, 2014). Il n'y a pas eu de pertes de colonies à l'issue de l'hivernage mais le développement des colonies a été perturbé lors de la seconde période apicole, avec 60% de remplacement des reines pour les colonies traitées, mais pas pour les colonies non traitées.

Des études ont aussi été menées sur les acaricides, qui sont appliqués *in situ*. Or, leur LD<sub>50</sub> chez l'abeille sont élevées et ils ont heureusement peu d'impact sur la viabilité des colonies. Un suivi sur deux ans de colonies traitées avec la formulation CheckMite+<sup>®</sup> (s.a. coupaphos) a montré une hausse du nombre de cellules royales, traduisant un certain trouble des colonies, sans pour autant induire une dépopulation ou une baisse d'activité (Berry *et al.*, 2013).

#### D.4.5.3. Les insecticides : un important facteur de risque dans les pertes de colonies ?

L'impact d'une exposition chronique aux insecticides sur la mortalité est difficile à mettre en évidence sur des colonies, en raison de leur capacité de résilience. Sur le terrain, le risque lié aux pesticides est plutôt étudié en observant leur co-occurrence dans les matrices de colonies avec des atteintes sanitaires. L'analyse de résidus pesticides d'un échantillonnage à grande échelle de matrices de colonies a permis d'associer des doses élevées de résidus **Tableau IX. Estimation du risque de mortalité d'ouvrières du aux insecticides** étudiés dans ce travail. Le risque a été calculé en utilisant les valeurs de LD<sub>50</sub> et les doses moyennes de substances actives (s.a.) dans le pollen et le nectar des données de la littérature. Le risque prend en compte la fréquence et la quantité des résidus (fréquence × dose / LD<sub>50</sub>). Un risque < 0,1 a été considéré comme négligeable par les auteurs. Le rang par ordre d'importance est indiqué entre parenthèse. D'après Sanchez-Bayo et Goka (2014).

	Risque topique	Risque oral		
	(n=92 s.a.)	(n=77 s.a.)		
	adulte <sup>a</sup>	larve <sup>b</sup>	nourrice <sup>c</sup>	butineuse <sup>d</sup>
Thiaméthoxame	29,58 (1)	2,77 (1)	4,80 (1)	200,18 (1)
Imidaclopride	10,34 (4)	1,19 (2)	1,57 (3)	23,33 (3)
Thiaclopride	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Deltaméthrine	3,27 (7)	<0,1	<0,1	<0,1
Fipronil	1,19 (15)	<0,1	0,27 (7)	<0,1
Coumaphos	0,41 (22)	0,11 (9)	<0,1	2,62 (6)

Calculs basés sur <sup>a</sup> une exposition topique à 1 g de pollen contaminé pendant 2 j; <sup>b</sup> l'ingestion de 1,1 mg/j de pollen et 28,9 mg/j de miel pendant 5 j; <sup>c</sup> l'ingestion de 6,5 mg/j de pollen pendant 10 j; <sup>d</sup> l'ingestion de 80,2 mg de nectar ou de miel pendant 30 j. d'imidaclopride (377 μg/kg de cadre et 60 μg/kg de propolis) ou de fipronil (150 et 170 μg/kg d'abeille) à des colonies faibles et peu populeuses (Pareja *et al.,* 2011).

Afin d'estimer l'importance des pesticides dans les pertes de colonies, des **facteurs de risque** peuvent être calculés. Ils varient selon les approches. La plupart prennent en compte leur occurrence dans les matrices des colonies et leur toxicité (LD<sub>50</sub>) sur abeille, reflétant un risque chronique (**Tableau IX**). Les néonicotinoïdes apparaissent parmi les insecticides les plus à risque. Une meilleure estimation nécessiterait une modélisation complexe prenant aussi en compte la formulation utilisée et son mode d'utilisation en agriculture, les éventuels métabolites produits, le degré d'exposition des abeilles à l'extérieur et à l'intérieur de la colonie, la biologie de l'abeille et la colonie, l'environnement de la colonie (ressources), *etc*. (Fischer & Moriarty, 2011 ; Van Der Valk *et al.*, 2013).

Il peut ainsi sembler hasardeux d'introduire de nouveaux insecticides sans apporter des informations complémentaires prenant en compte leur toxicité à long terme. Les réglementations actuelles ne considèrent que la toxicité pour l'abeille fondée sur la LD<sub>50</sub> et n'imposent pas d'évaluation de la toxicité chronique des substances ou des formulations pour une mise sur le marché. C'est l'accumulation de données observationnelles qui ont amené au retrait de plusieurs substances du marché après plusieurs années d'utilisation.

À part lors d'une exposition aigüe, il est souvent difficile d'établir un lien de causalité incontestable entre la présence d'un insecticide et un cas de mortalité de colonie. Pourtant les insecticides, qui peuvent avoir des effets à faible dose, semblent bien être des facteurs de risque, suggérant qu'ils agiraient en interactions avec d'autres facteurs de stress, par exemple en affaiblissant et en sensibilisant les colonies. C'est pourquoi ils sont de plus en plus étudiés en association avec d'autres substances actives ou avec des agents pathogènes.



**Figure 47. Nombre de molécules de pesticides dans des colonies transhumantes** aux Etats-Unis. **A.** Nombre moyen (± erreur-type) de susbtances (ou de leurs métabolites) détectées dans les abeilles (n=38 échantillons, m=13 molécules détectées au total), le pain d'abeille (n=147, m=67) et la cire (n=108, m=70). Tous les échantillons de pain d'abeille et de cire comprenaient au moins une et trois molécules respectivement. **B.** Nombre moyen de molécules détectées dans la cire de colonies ayant survécu ou non à la saison apicole. L'étoile dénote une différence significative entre les deux conditions ( $\chi^2$ =7,3; df=1; n=70; p=0,0069). D'après Traynor *et al.* (2016).



**Figure 48. Nombre de virus différents détectés dans les abeilles**. 68% des individus (n=1064) portent au moins deux des onze virus recherchés. D'après D'Alvise *et al*. (2019).

# **E.** LES INTERACTIONS ENTRE FACTEURS DE STRESS

Les abeilles sont exposées à une variété de facteurs de stress dont aucun n'explique à lui seul les pertes de colonies observées (*cf.* A.3). L'origine du déclin des abeilles semble donc multicausale (vanEngelsdorp *et al.,* 2009 ; Potts *et al.,* 2010a ; Goulson *et al.,* 2015). En outre, la fréquente co-exposition des abeilles à différents facteurs de stress suggère que ceux-ci pourraient cumuler leurs effets délétères, voire interagir entre eux. En effet, au laboratoire, il a été montré que certains facteurs de stress ont des effets **synergiques** néfastes. Des co-expositions, généralement binaires, ont ainsi été étudiées, que ce soit entre deux contaminants biotiques ou abiotiques, ou entre un contaminant et un facteur environnemental ou climatique.

# E.1. Les abeilles sont simultanément exposées à plusieurs facteurs de stress

La détection de résidus pesticides dans les matrices des colonies montre que l'exposition des abeilles est généralement multiple. Une recherche de résidus dans des colonies en transhumances aux Etats-Unis a montré que les abeilles, le pain d'abeilles et la cire contenaient en moyenne 1,4 ; 7,2 et 10,2 résidus différents respectivement (**Fig. 47A** ; Traynor *et al.*, 2016), avec une forte prévalence des substances insecticides. De plus, les cires des colonies victimes d'effondrement contenaient en moyenne plus de molécules différentes (**Fig. 47B**), suggérant un rôle de la multiplicité des expositions dans la santé des colonies.

Concernant les pathogènes, la plupart des abeilles sont porteuses de plusieurs virus. En recherchant 11 virus dans les abeilles de cinq ruchers en Allemagne, D'Alvise *et al.* (2019) ont observé une moyenne de 2,1 virus par abeilles et 68% de celles-ci portaient au moins deux virus (**Fig. 48**). Les cooccurrences sont encore plus fréquentes en prenant en compte d'autres pathogènes, avec, par exemple, des corrélations entre l'abondance du BQCV d'une part, et du DWV, du LSV, de *P. larvae*, de *N. ceranae*, des trypanosomes (*C. mellificae* ou *L. passim*) d'autre part, ou entre l'abondance du LSV et des trypanosomes. *V. destructor* étant porteur de virus de l'abeille, il y a également une fréquente cooccurrence entre ce parasite et plusieurs virus (**Tab. II**), avec par exemple une corrélation entre la charge parasitaire et la charge virale en DWV et en complexe viral AKI (qui regroupe ABPV, KBV et IAPV) (Nazzi *et al.,* 2012 ; Francis *et al.,* 2013).

Il y existe donc bien une large co-exposition des abeilles à différents facteurs de stress, biotiques et abiotiques, pouvant interagir. Cependant le nombre d'interactions possibles augmente exponentiellement avec le nombre de facteurs de stress. Pour étudier expérimentalement leurs effets combinés, il est donc nécessaire de sélectionner les **facteurs de stress les plus à risque**, c'est-à-dire les plus fréquents et les plus létaux.

# **E.2. Exemples d'interactions entre facteurs de stress**

Les interactions ont principalement été mesurées sur la mortalité, mais d'autres paramètres peuvent être significativement ou spécifiquement modulés en présence d'un mélange. Pour savoir si deux facteurs interagissent, il existe plusieurs modèles (additivité des doses, additivité des réponses). Pour un phénomène mesurable comme la mortalité, les études utilisent le plus souvent un modèle d'indépendance des réponses. On compare la réponse observée à la réponse attendue, calculée en considérant que les composants agissent indépendamment l'un de l'autre. Si l'effet observé est statistiquement plus fort ou plus faible que l'effet attendu, il y a respectivement une interaction synergique ou antagoniste.

# E.2.1. Interactions entre toxiques

Des fongicides ou insecticides peu toxiques peuvent accroitre la toxicité d'insecticides neurotoxiques pyréthrinoïdes (Colin & Belzunces 1992; Pilling & Jepson, 1993), néonicotinoïdes ou assimilés (Iwasa et al., 2004 ; Thompson et al., 2014 ; Tosi & Nieh, 2019) et organophosphorés (Johnson et al., 2013). Par exemple, le tébuconazole (0,447 μg/ab) agirait en synergie sur la toxicité de contact de l'imidaclopride et du thiaméthoxame en réduisant leur LD<sub>50</sub> d'un facteur 1,93 et 2,59 respectivement (Thompson et al., 2014). Chez les larves, l'acaricide coumaphos (0.8 mg/L) et l'insecticide chlorothalonil (34 mg/L) ont un effet synergique transitoire, après 4 jours de traitement OC, sur la mortalité (Zhu et al., 2014). Dans la même étude, l'effet d'une combinaison entre le fluvalinate (3 mg/L) et le chlorothalonil (34 mg/L) varie fortement avec la dilution du mélange, avec une synergie au 4<sup>e</sup> jour sur la mortalité avec le mélange initial, et un effet antagoniste après 6 j avec une dilution au 1:10<sup>e</sup> du mélange. Cela montre que l'effet d'une combinaison peut grandement varier avec la concentration des molécules. Les effets synergiques observés avec ces substances pourraient être dus à une inhibition des CYP par certains fongicides, acaricides ou insecticides, comme cela a été démontré avec le piperonyl butoxide (PBO), utilisé comme synergisant dans certaines formulations insecticides (Glavan & Božič, 2013).

Ces interactions n'ont pas été uniquement observées au niveau de la mortalité. Williamson & Wright (2013) ont exposé des ouvrières de manière OC à un mélange comprenant l'imidaclopride et le coumaphos. Ils n'ont pas observé d'effet combiné sur la mortalité mais des altérations des capacités de discrimination olfactive qui n'ont pas été observées avec les substances seules. Une synergie entre des formulations basées sur la clothianidine (néonicotinoïde) et le  $\lambda$ -cyhalothrine (pyréthrinoïde) a été observée sur la réduction de la masse corporelle d'ouvrières sans pour autant avoir un impact sur la mortalité (Yao *et al.,* 2018). L'action conjointe de la deltaméthrine et d'un fongicide a également eu montré un effet spécifique sur la thermorégulation des abeilles en induisant une hypothermie chez les individus exposés (Vandame & Belzunces 1998).



Figure 49. Synergie entre *N. ceranae* et le fipronil sur la mortalité des abeilles. Les courbes représentent les proportions cumulées de survie (Kaplan-Meier) d'abeilles non traitées (bleu), infectées par *N. ceranae* (rouge), intoxiquées au fipronil (vert) ou exposées aux deux traitements (rose). Les traitements ont été appliqués sur des abeilles émergentes maintenues en cagettes, qui ont été infectées ou non avec des spores de *N. ceranae* (flèche) puis exposées ou non pendant 7 j à une faible dose (1 µg/L OC) de fipronil (grisé). La mortalité cumulée après 22 j a montré une synergie entre les deux facteurs de stress ( $\chi^2$ =11,7; df=1; p<0,01), avec 84% de mortalité observée contre 58% attendue pour une absence d'interaction. Aufauvre *et al.* (2012).

# E.2.2. Interactions entre pathogènes

L'association entre pathogènes la plus connue chez l'abeille est certainement celle entre *Varroa destructor* et le DWV, où le parasite aurait un rôle de vecteur du virus mais amplifierait aussi sa réplication (Annoscia *et al.,* 2019). L'impact synergique de ces deux pathogènes pourrait être lié à un syndrome d'immunosuppression représenté par une sous-expression de gènes impliqués dans l'immunité cellulaire (PGRP, phagocytose) et humorale (effecteur NF-KB dorsal-A1) (Nazzi *et al.,* 2012). La réplication mais aussi la virulence d'autres virus, comme le complexe viral AKI, seraient aussi positivement corrélées avec *V. destructor* (Francis *et al.,* 2013).

Concernant *N. ceranae*, celle-ci peut également avoir un impact significatif sur la réplication virale. Une inoculation expérimentale de CBPV et *N. ceranae* a révélé un effet synergique positif sur le nombre de copies du génome viral (Toplak *et al.,* 2013). Un tel effet a également été observé avec le DWV. Bien que le titre du virus soit le même après 6 j chez les abeilles infectées ou non par *N. ceranae*, la quantité de DWV est plus importante au premier stade de développement du virus en présence du parasite, suggérant un développement accéléré du DWV (Zheng *et al.,* 2015). Enfin, *N. ceranae* et le BQCV agiraient en synergie sur la mortalité des abeilles (Doublet *et al.,* 2015).

Des co-occurrences ont également été relevées pour *N. ceranae* avec *N. apis* chez l'abeille, mais aussi avec d'autres parasites eucaryotes comme les trypanosomes *L. passim* et *C. mellificae*. Des infections expérimentales avec *N. ceranae* et *N. apis* ont révélé une perturbation des capacités de mémorisation spécifique à la co-infection (Charbonneau *et al.,* 2016). Si la co-infection avec *N. ceranae* et *L. passim* ne semble pas avoir d'impact particulier sur la charge parasitaire des deux pathogènes (Tritschler *et al.,* 2017), la co-infection expérimentale de *C. mellificae* et *N. ceranae* induirait une modulation spécifique de l'expression de certains gènes codant pour des AMP (Schwarz & Evans, 2013).

# E.2.3. Interactions entre pathogènes et toxiques

Plusieurs études ont porté sur l'impact d'une co-exposition entre *N. ceranae* et des insecticides neurotoxiques, notamment ceux étudiés dans ce travail. Des effets synergiques ont parfois été observés sur la mortalité avec des expositions chroniques à l'imidaclopride dès 0,7 ng/g (Alaux *et al.*, 2010), au thiaclopride dès 0,1 ng/g (Vidau *et al.*, 2011; Retschnig *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015), au thiaméthoxame (Tesovnik *et al.*, 2020) et au fipronil (dès 16,4 pg/ab/j) (Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012; **Fig. 49**).

Une consommation de sirop de saccharose significativement plus importante dans le cas de co-exposition a, parfois, pu être observée, par exemple en réponse à un traitement combinant *N. ceranae* et imidaclopride (Alaux *et al.,* 2010). Des modifications de l'expression de gènes liés à la détoxication et à l'immunité (CYP, catalase, glucose déshydrogénase ou AMP) ont également été observées spécifiquement en réponse aux combinaisons de

*N. ceranae* avec le fipronil, le flupyradifurone ou le thiaméthoxame (Aufauvre *et al.,* 2014 ; Naggar & Baer, 2019 ; Tesovnik *et al.,* 2020). Par ailleurs, la combinaison parasiteimidaclopride peut aussi induire une diminution significative de l'activité enzymatique de la glucose oxydase, liée à l'immunité (Alaux *et al.,* 2010). Enfin, dans un contexte de synergie entre *N. ceranae* et un insecticide, la présence d'un néonicotinoïdes ou du fipronil peut induire respectivement une hausse ou une baisse de la charge sporale de *N. ceranae* (Vidau *et al.,* 2011), mais ce n'est pas systématique (Alaux *et al.,* 2010 ; Aufauvre *et al.,* 2012), suggérant que la synergie n'est pas corrélée à un meilleur succès parasitaire.

Concernant d'autres pathogènes, une dose sublétale de clothianidine et une infection à *P. larvae* ont un effet synergique sur la mortalité des abeilles (López *et al.,* 2017). Cette coexposition a notamment eu un impact sur l'immunité cellulaire, avec une diminution du taux d'hémocytes dans l'hémolymphe. Un mélange comprenant du thiaméthoxame et de l'imidaclopride a augmenté la mortalité d'abeilles parasitées par *V. destructor*.

En altérant les capacités du système immunitaire des abeilles à résister aux infections virales, les insecticides favoriseraient la prolifération de virus (Nazzi & Pennacchio, 2018). Cela a notamment été montré pour les néonicotinoïdes : la clothianidine induit une augmentation de la charge virale du DWV, l'imidaclopride celle du DWV et du CBPV et le thiaclopride celle du BQCV (Di Prisco *et al.,* 2013 ; Doublet *et al.,* 2015 ; Diao *et al.,* 2018). Une plus forte réplication du DWV a également été observée en présence de tau-fluvalinate (Locke *et al.,* 2012).

Il reste cependant difficile de déterminer si les insecticides sensibilisent l'abeille à un pathogène, par exemple *via* une immunosuppression, et/ou si à l'inverse un pathogène affaiblit l'abeille et la sensibilise aux neurotoxiques, par exemple *via* une augmentation de la perméabilité intestinale ou une atteinte neurologique dans le cas de *N. ceranae*.
# E.3. Les objectifs de la thèse

Le projet de thèse avait pour but d'étudier les **interactions entre facteurs de stress chez** *A. mellifera* et de proposer des pistes quant à leurs **modes d'action** en analysant les fonctions atteintes lorsqu'ils sont appliqués seuls et en combinaison. Ce travail s'est orienté sur l'impact de deux facteurs de stress les plus fréquemment détectés dans les colonies, un facteur biotique, *N. ceranae*, et des facteurs abiotiques, **les insecticides neurotoxiques**.

L'intestin de l'abeille a été particulièrement étudié. C'est un organe particulièrement exposé puisque c'est à la fois le site de développement du pathogène et le site d'absorption des xénobiotiques ingérés. Par ailleurs, il contient des communautés microbiennes dont le rôle est essentiel dans son homéostasie. Cependant les perturbations de l'équilibre des communautés par les contaminants biotiques et abiotiques restent méconnues.

C'est pourquoi une première étude a porté sur la réponse du **microbiote intestinal** de l'abeille à *N. ceranae* ou à une intoxication chronique avec des insecticides de quatre familles différentes. Il s'agissait de savoir quels groupes bactériens majoritaires du microbiote **répondent à un stress** et si cette réponse présente des **spécificités** selon le facteur de stress.

La plus grande partie du travail de thèse a ensuite consisté à étudier une **combinaison ternaire** incluant *N. ceranae*, et des formulations commerciales d'insecticides à base de deltaméthrine et/ou de thiaclopride. Les objectifs étaient d'étudier les **effets aigus de formulations** et non de molécules pures, afin de voir une éventuelle **synergie lors de leur combinaison**, entre eux et avec le parasite microsporidien, et d'identifier les **fonctions altérées** par ces facteurs de stress, seuls ou en combinaisons, chez l'abeille.

# RESULTATS ET DISCUSSION

# **AVANT-PROPOS**

Les expérimentations réalisées et les résultats obtenus lors du travail de thèse sont présentés sous la forme de deux publications.

• Le premier est un article publié en 2019 dans la revue à comité de lecture *Microbes and Environments* (Volume 34, No. 3, pp. 226-233, doi : 10.1264/jsme2.ME18169). Il est intitulé "The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposures to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*".

Dans cet article nous avons étudié, en laboratoire, la réponse du microbiote intestinal de l'abeille après une infection par *N. ceranae* ou une exposition chronique à quatre insecticides neurotoxiques (le fipronil, le thiaméthoxame, l'imidaclopride et le coumaphos). L'impacts de ces facteurs de stress sur le microbiote a été étudié par PCR quantitative afin de comparer l'abondance de cinq groupes majoritaires du microbiote : les *Lactobacillus*, le clade *Lactobacillus* Firm-5 seul, *Bifidobacterium spp*, et les Gammaprotéobactéries *Gilliamella apicola* et *Snodgrassella alvi*. Les modifications du microbiote observées pourraient traduire une dysbiose qui participerait à l'altération de la santé de l'hôte. Une autre publication, pour laquelle je suis co-auteur (*cf.* Annexe), s'est inscrite dans la même réflexion en étudiant cette fois l'impact de l'herbicide glyphosate.

• Le deuxième chapitre est présenté sous forme d'article qui sera très prochainement soumis dans une revue. Il est intitulé "Effects of binary or ternary mixtures containing the parasite Nosema ceranae and insecticides formulations on the honeybee".

L'article porte sur l'impact de *N. ceranae*, d'expositions de contact à des formulations insecticides, et à leurs combinaisons. Dans une première expérimentation des abeilles ont été exposées au parasite *N. ceranae*, à une formulation commerciale comprenant deux insecticides, le Proteus<sup>®</sup> (s.a. deltaméthrine et thiaclopride), et à la combinaison des deux. Dans une deuxième expérimentation des abeilles ont été exposées à *N. ceranae*, au Decis<sup>®</sup> (s.a. deltaméthrine), et aux combinaisons binaires et ternaire de ces facteurs de stress. Les expositions aux insecticides ont été réalisées en mimant des intoxications aigues par pulvérisation des formulations commerciales à des doses inférieures à celles recommandées par le fabriquant. Afin d'étudier l'impact des facteurs de stress et leurs interactions, différentes approches ont été considérées : impact suivi de la survie et la consommation de sirop de saccharose, mesures de LD<sub>50</sub>, analyses transcriptomiques par séquençage ARN et RT-QPCR, dosage d'activités enzymatiques, analyse de l'abondance des groupes bactériens du microbiote par séquençage 16S et QPCR. Ces analyses ont permis d'identifier des fonctions impactées par les facteurs de stress et leur combinaison.

Ma thèse a été financée par l'**Agence Nationale de la Recherche**, via le projet "Interactions entre les pathogènes et les mélanges de pesticides chez l'abeille" (MIXTRESS, coordinateur Luc Belzunces), puis prolongée par l'**Université Clermont-Auvergne**. Les travaux et les missions ont été financés par le projet **ANR MIXTRESS**, par le projet **EC2CO du CNRS** "Contaminants des abeilles de lignée A en milieu tropical insulaire" (CALAMiTI, coordinateur N. Blot) et par les fonds propres du **LMGE**. Durant ce travail, j'ai eu l'opportunité d'être accueilli dans trois unités de recherche :

- Ie Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (UMR 6023 CNRS-UCA, dir. Télesphore Sime-Ngando), mon laboratoire d'accueil à Clermont-Ferrand, où j'étais membre de l'équipe Interactions hôtes-parasites, animée par Frédéric Delbac,
- I'unité Abeille et Environnement (UR406 INRA, dir. Mickaël Henry) à Avignon, où j'ai été accueilli 4 mois au total dans l'équipe Toxicologie environnementale, animée par Luc Belzunces,
- I'unité Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (UMR CIRAD-Univ. Réunion, dir. Bernard Reynaud) à Saint-Pierre, où j'ai été accueilli 5 mois dans l'équipe Dynamiques écologiques en milieu insulaire, animée par Hélène Delatte.

# **F.** THE HONEYBEE GUT MICROBIOTA IS ALTERED AFTER CHRONIC EXPOSURES TO DIFFERENT FAMILIES OF INSECTICIDES AND INFECTION BY *NOSEMA CERANAE*

## 2019, Microbes and Environments, Volume 34, Issue 3, p 226-233.

Régis Rouzé<sup>1</sup>, Anne Moné<sup>1</sup>, Frédéric Delbac<sup>1</sup>, Luc Belzunces<sup>2</sup> and Nicolas Blot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", F-63000 Clermont–Ferrand, France.

<sup>2</sup> INRA, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, CS 40509, 84914 Avignon, France.

*Running title*: Insecticides, *Nosema* & bee gut symbionts *Keywords* : Honeybee microbiota, insecticides, parasite, dysbiosis

# F.1. Résumés

### F.1.1. Résumé en français

L'intestin de l'abeille européenne Apis mellifera est le site d'exposition à de multiple facteurs de stress tels que les pathogènes et les produits chimiques qui ont été ingérés. Ces facteurs de stress pourraient en outre altérer le microbiote intestinal, qui contribue à l'homéostasie de son hôte. L'abondance relative des taxa bactériens majoritaires de l'intestin a été évaluée par RT-PCRQ en réponse à l'infection par le parasite intestinal Nosema ceranae ou à une exposition chronique à de faibles doses de quatre insecticides neurotoxiques : le coumaphos, le fipronil, le thiamethoxame et l'imidaclopride. Des expérimentations ont été réalisées en conditions de laboratoire sur des ouvrières adultes échantillonnées dans des colonies en hiver et en été, révélant des changements saisonniers dans la composition des communautés bactériennes. N. ceranae et une exposition létale de fipronil ont induit une augmentation de l'abondance relative de Gilliamella apicola et Snodgrassella alvi chez les abeilles d'hiver survivantes. Le parasite et une exposition sublétale aux quatre insecticides a conduit à une diminution de l'abondance de Bifidobacterium spp. et de Lactobacillus spp. en hiver comme en été. Les effets similaires induits par des insecticides appartenant à des familles moléculaires distinctes suggèrent un mode d'action commun et indirect sur le microbiote, possiblement à travers une altération aspécifique de l'homéostasie intestinale. Les données ont montré qu'une infection et une exposition chronique à de faibles doses d'insecticides ont des effets sur l'ensemble de l'holobionte.

 <sup>\*</sup> Corresponding author. Dr. N. Blot, LMGE, Campus des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, TSA 60026,
63178 Aubière Cedex, France. Phone: (+33) 4 73 40 74 57. Email: <u>nicolas.blot@uca.fr</u>

# F.1.2. Abstract

The gut of the European honeybee Apis mellifera is the site of exposure to multiple stressors such as pathogens and ingested chemicals. Therefore, the gut microbiota, which contributes to the host homeostasis, may be altered by these stressors. The abundance of the major bacterial taxa of the gut was evaluated in response to infection with the intestinal parasite Nosema ceranae or to a chronic exposure to low doses of the neurotoxic insecticides coumaphos, fipronil, thiamethoxam and imidacloprid. Experiments were performed in laboratory conditions on adult workers collected from hives in February (winter bees) and in July (summer bees) and revealed season-dependent changes in the bacterial community composition. N. ceranae and a lethal fipronil treatment increased the relative abundance of both Gilliamella apicola and Snodgrassella alvi in surviving winter honeybees. The parasite and sublethal exposure to all insecticides led to a decreased abundance of Bifidobacterium spp. and Lactobacillus spp. whatever the season. The similar effects induced by insecticides belonging to distinct molecular families suggested a shared and indirect mode of action on the gut microbiota, possibly through aspecific alterations of the gut homeostasis. These data showed that an infection and chronic exposures to low concentrations of insecticides may have effects on the honeybee holobiont.

# F.2. Introduction

In their environment, insects are exposed to many stressors and their gut is particularly exposed given that this organ is both the site of development of many pathogens and the site of exposure to ingested xenobiotics. At the interface between the environment and the insect, the gut microbiota is known to be sensitive to biotic and abiotic stressors. The consequences for the host of a dysbiosis may be pleiotropic as the microbiota is connected with the gut physiology, the nervous and the immune systems (56, 71).

The environmental stressors of the European honeybee (*Apis mellifera*) have received a lot of interest due to the ecological and economical importance of this pollinator and to the colony losses that have been observed worldwide over the last decades (19, 79). The origin of these losses is assumed to be multicausal, involving pathogens, such as the highly prevalent gut parasite *Nosema ceranae*, and agrochemical contaminants, especially neurotoxic insecticides (34, 39).

*N. ceranae* is a fungal-related parasite belonging to *Microsporidia*. This obligate intracellular parasite proliferates within the epithelial cells of the adult honeybee midgut and affects metabolic, digestive and immune functions as well as the gut epithelium renewal rate (5, 39, 64). Consequently, *N. ceranae* can reduce the honeybee lifespan and may provoke colony depopulation.

Honeybees are also exposed to a variety of pesticides through the foraging of contaminated pollen and nectar that are brought back to the colony (10). Some chemicals are deliberately

introduced into the hives by beekeepers, especially the acaricides used against the ectoparasite *Varroa destructor*. All these pesticides can be detected in the hive matrices including wax, pollen and honey (8, 18, 51, 62). All colony members are thus chronically exposed, especially through their diet. The most abundant and ubiquitous contaminants of matrices are varroacides. Systemic insecticides commonly used in agriculture, including neonicotinoids and phenylpyrazoles, are also frequently detected in the hives. All these compounds are neurotoxic insecticides (14). Even at low doses, they can alter the honeybee behavior, learning and memory, and induce an immune response and an increase in detoxifying activities (9, 17, 20, 32, 33). Some of these effects, including cell damages, were also observed in the midgut (5, 13, 15, 63).

*N. ceranae* and ingested pesticides are in contact with the honeybee gut and may alter its physiology. Therefore, the composition and function of the gut microbial communities may be affected by these stressors (35, 44, 53). The worker honeybee gut core microbiota, that is shared among individuals, is composed of five major bacterial taxa comprising the *Lactobacillus* Firm-4 and *Lactobacillus* Firm-5 clades, the *Gammaproteobacteria Gilliamella apicola* and *Snodgrassella alvi*, and species related to the *Bifidobacterium asteroides* cluster (49). Other taxa, although less abundant, are present, especially *Alphaproteobacteria*. Most of the 108 to 109 intestinal bacteria are localized within the hindgut. The crop and the midgut are much less colonized (36). The intestinal microbiota contributes to the host homeostasis. It stimulates the immune system, constitutes a biological barrier against pathogens and participates in digestion (29, 49, 50, 52, 80). Thus, the impact of stressors on the honeybee and its gut could be explained, at least partially, by an imbalanced microbiota, *i.e.* a dysbiosis.

In this study, we investigated how the honeybee gut microbiota composition can be affected, in laboratory conditions, after infection with *N. ceranae*, or after a chronic exposure to neurotoxic insecticides belonging to three families: the phenylpyrazole fipronil, the neonicotinoids thiamethoxam and imidacloprid, and the organophosphate acaricide coumaphos. Quantitative real-time PCR (QPCR) was used to assess changes in the abundance of the major bacterial groups of the honeybee core microbiota, namely *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, and the species *G. apicola* and *S. alvi*.

# F.3. Materials and Methods

# F.3.1. Honeybee artificial rearing, infection with *N. ceranae* and chronic exposure to insecticides

Two experiments were performed using *A. mellifera* interior worker bees collected on frames of five colonies of the same apiary at the Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (Clermont-Ferrand, France) in February 2017 (winter bees) and in July 2017 (summer bees). Each of the five colonies represented an independent replicate. Honeybees were

anesthetized with  $CO_2$  and placed into groups of 70 individuals in Pain-type cages containing a 5 mm piece of PseudoQueen (Inkto Supply Ltd, Vancouver, Canada). Honeybees were kept at 33 ± 1°C under humidified atmosphere and fed *ad libitum* with 50% (w/v) sucrose syrup supplemented with 1% (w/v) Provita'Bee (ATZ Diététic, Mas Cabardès, France) as previously described (4). Dead bees were removed and sucrose consumption was quantified daily.

Seven experimental groups, including untreated control, were tested for each colony replicate. Honeybees were collectively infected using a feeder containing approximatively 150 000 spores per bee in 2.5 mL of sugar syrup that was maintained for 24 to 34 h until complete consumption. *N. ceranae* spores were obtained from previously infected honeybees and purified according to Vidau *et al.* (81). Chronic exposure to insecticides was performed by feeding non-infected honeybees with sugar syrup supplemented with either 0.25  $\mu$ g/kg or 1.0  $\mu$ g/kg fipronil, 650  $\mu$ g/kg coumaphos, 1.7  $\mu$ g/kg thiamethoxam, or 3.5  $\mu$ g/kg imidacloprid. Insecticide stock solutions were prepared in DMSO, leading to a final concentration of 0.05% DMSO (v/v) in the syrup. Non-intoxicated bees (*i.e.* untreated control and infected honeybees) were fed with syrup supplemented with 0.05% DMSO. According to the acute lethal dose (LD50) (62), the daily mean consumption of insecticides was below 1:194<sup>th</sup> of the LD50 for coumaphos, thiamethoxam and imidacloprid, and below 1:550<sup>th</sup> and 1:150<sup>th</sup> of the LD50 for the low and high fipronil exposure respectively (**Suppl. Fig. S1**).

# F.3.2. Gut sampling and DNA purification

Honeybees were sacrificed 18 days after experiment initiation, but 15 days for the highest dose of fipronil due to high mortality, along with the corresponding controls. For each replicate, the hindguts of 7 honeybees were dissected on ice, pooled, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The presence or absence of *N. ceranae* spores was checked by microscopy (x400) before pooling. The samples were homogenized in 800  $\mu$ L of RLT buffer (Qiagen) and grinded using a microtube pestle. The mixture was transferred to a tube containing 0.150 g of 0.1 mm silica beads and cells were mechanically disrupted by a set of 6 bead-beating pulses of 30 s at 30 Hz, with 30 s interruptions (28). After 3 series of thermal shocks at 65°C and in liquid nitrogen, samples were centrifuged at 8000 x *g* for 5 min and 200 to 300  $\mu$ L of clear supernatant were transferred to a new tube, carefully avoiding both pelleted and floating slimy materials. One volume of ethanol containing 1% (v/v) of 2-mercaptoethanol was added to the sample, then transferred to a DNeasy spin column for DNA purification (DNeasy Mini Kit, Qiagen). DNA concentration was quantified using bisBenzimide DNA Quantitation Kit, Fluorescence Assay (Sigma-Aldrich).

# F.3.3. PCR quantification of bacterial taxa abundance

The theoretical specificity of primer pairs for the 16S rRNA gene was evaluated using the Testprime 1.0 tool (46) to estimate the coverage of bacterial taxa from the SILVA 132 database. Coverage was also estimated on honeybee microbiota 16S rRNA sequences from

### Table 1. Primer pairs tested for the QPCR quantification of the honeybee microbiota major bacterial taxa.

Selected pairs are indicated by an  $^{\ast}$ 

Primer pairs and sequences (5'→3')	Targeted group and % coverage in SILVA database (in honeybee microbiota)	Amplicon size (bp)	Linearity (r <sup>2</sup> ) Efficiency (E)	validated DNA range <sup>a</sup> and C <sub>Q</sub> range	Refe- rence
Bacteria					
341F CCTACGGGAGGCAGCAG * 534R ATTACCGCGGCTGCTGGCA *	Bacteria 81.7	169-195	$r^2 = 0,999$ 50 pg to 50 E = 0,92 $C_Q$ 10 to 2		11
BAC338F ACTCCTACGGGAGGCAG * BAC805R GACTACCAGGGTATCTAATCC *	Bacteria 77.4	443-469	r² = 0,999 E = 0,85	50 pg to 10 ng <sup>b</sup> C <sub>Q</sub> 13.5 to 23	86
BACT1369F CGGTGAATACGTTCYCGG PROK1492R GGWTACCTTGTTACGACTT	Bacteria 25.4	133-146	r² = 0,999 E = 0,84	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 11 to 23	77
926F AAACTCAAAKGAATTGACGG 1062R CTCACRRCACGAGCTGAC	Bacteria 78.4	172-179	r² = 0,999 E = 0,87	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 11 to 22	6
Bifidobacterium spp.					
Bifi-F2 TCGCGTCYGGTGTGAAAG * Bifi-R2 CCACATCCAGCRTCCAC *	Bifidobacteriaceae 89.3 Bifidobacterium spp. 89.0 (96.1, n=51)	243	r² = 0,999 E = 0,78	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 14.5 to 25	70
Bifi-F1 CAAGCGAGAGTGAGTGTACC Bifi-R1 GCCGATCCACCGTTAAGC	Bifidobacterium spp. 2.5 (88.7, n=53)	165	$r^2 = 0,999$ 50 pg to 50 n E = 0,90 $C_Q$ 14.5 to 25		53
Act920F3 TACGGCCGCAAGGCTA Act1200R TCRTCCCCACCTTCCTCCG	Actinobacteria 86.7 Bifidobacteriaceae 84.8 Bifidobacterium spp. 86.5 (94.2, n=52)	299-307	r <sup>2</sup> = 0,999 E = 0,67	not validated	6
Lactobacillus spp.					
Lact-F1 TAACGCATTAAGCACTCC * Lact-R1 GCTGGCAACTAATAATAAGG *	Lactobacillus 3 (28.6, n=1705) L. kunkeei (0, n=875) Firm-4 (0, n=88) Firm-5 (97.2, n=424)	270	r <sup>2</sup> = 0,998 E = 0,89	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 13.5 to 24.5	53
Lact-F2 AGCAGTAGGGAATCTTCCA * Lact-R2 CACCGCTACACATGGAG *	Lactobacillus 87.2 (95.7, n=1690) L. kunkeei (96.8, n=875) Firm-4 (97.7, n=88) Firm-5 (91.7, n=424)	341	r <sup>2</sup> = 0,997 E = 1,08	50 pg to 10 ng <sup>b</sup> C <sub>Q</sub> 14 to 23	70
928F-Firm TGAAACTYAAAGGAATTGACG 1040FirmR ACCATGCACCACCTGTC	Firmicutes 73.7 Lactobacillales 73.3 Lactobacillus (43.6) (69.1, n=1705) L. kunkeei (97.7-8, n=875) Firm-4 (97.7, n=88) Firm-5 (0.5, n=424) Mollicutes 39.8	149-157	r² = 0,998 E = 0,83	50 pg to 10 ng <sup>b</sup> C <sub>Q</sub> 14.5 to 23.5	6
Alphaproteobacteria					
a682F CDAGTGTAGAGGTGAAATT * 908aR CCCCGTCAATTCCTTTGAGTT *	Alphaproteobacteria 63.6 Bartonella 25.4 (89.6, n=77) Acetobacteraceae 0.8 (10.0, n=201)	245-250	r <sup>2</sup> = 0,998 E = 0,91	50 pg to 50 ng $C_{\rm Q}$ 14.5 to 25	6
Gammaproteobacteria					
1080vF TCGTCAGCTCGTGTYGTGA * v1202R CGTAAGGGCCATGATG *	Gammaproteobacteria 61.2 Gilliamella 96.9 (97.1, n=516) Snodgrasella 0 (0, n=342) Enterobacteriales 94.0	146-160	r <sup>2</sup> = 0,999 E = 0,90	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 14.5 to 25	6
Snodgrasella alvi					
Neiss-F AAGCGGTGGATGATGTGG * Neiss-R TGATGGCAACTAATGACAAGG *	Neisseriaceae 79.4 Snodgrassella 86.4 (95.1, n=344) Snodgrassella alvi 100 (95.6, n=226)	194-199	r <sup>2</sup> = 0,999 E = 0,90	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 13.5 to 23.5	53
Beta-1009-qtF CTTAGAGATAGGAGAGTG * Beta-1115-qtR AATGATGGCAACTAATGACAA	Snodgrasella 77.3 (93.0, n=344) * Snodgrassella alvi 76.9 (94.2, n=226)	127-128	r² = 0,999 E = 0,87	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 15 to 24	60
Snod-F GGAATTTCTTAGAGATAGGAAAGTG Snod-R TTAATGATGGCAACTAATGACAA	Snodgrasella 11.4 (0, n=344) Snodgrassella alvi 23.1 (0, n=226)	136	r <sup>2</sup> = 0,999 E = 0,86	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 15 to 26	85
Gilliamella apicola	Cillian alla 22.0.171 (m. 222)	24.0	3 0 000	50 . 50	6.0
G1-459-qtF GTATCTAATAGGTGCATCAATT * G1-648-qtR TCCTCTACAATACTCTAGTT *	Gilliamella 23.0 (71.6, n=232) Gilliamella apícola 22.9 (80.7, n=109)	210	r² = 0,999 E = 0,91	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 14.5 to 25.5	60
Gill-F CCTTTGTTGCCATCGATTAGG Gill-R GACATTCTGATTCACGATTACTAGC	Gilliamella 28.0 (1.7, n=355) Gilliamella apícola 37.5 (0.9, n=233)	249	r <sup>2</sup> = 0,999 E = 0,83	50 pg to 50 ng C <sub>Q</sub> 16.5 to 28	85
Past-F TTGTTGCCAGCGATTAGG Past-R ATTCTGATTCACGATTACTAGC	Gilliamella apícola 4.2 (2.1, n=233) Frischella perrara 100 (94.9, n=59)	243	r <sup>2</sup> = 0,998 E = 0,75	200 pg to 50 ng <sup>c</sup> C <sub>Q</sub> 18 to 27.5	53
Bacteroidetes					
798cfbF CRAACAGGATTAGATACCCT cfb967R GGTAAGGTTCCTCGCGTAT	Bacteroidia 86.2 (100, n=44) Spirochaetaceae 42.8	202-208	r² = 0,998 E = 0,90	50 pg to 50 ng $C_{\rm Q}21.5$ to 33 $^{\rm d}$	6

<sup>e</sup> total DNA from the honeybee gut
<sup>b</sup> not quantitative for higher DNA concentrations
<sup>c</sup> not quantitative for lower DNA concentrations
<sup>d</sup> high C<sub>Q</sub> precluded any analyses

previous experiments (2, 21, 23, 59, 61, 83), requiring sequence assignment and selection. Taxonomic assignment was performed through Blast search against the SILVA 132 database, keeping only sequences with >98% of identity. Corby-Harris *et al.* (21) data were used to assign *Lactobacillus* sp. sequences to the Firm-4 and Firm-5 clades. For each primer set only the sequences covering the whole amplicon were considered and sequences with ambiguous positions in the priming regions were removed. Primer sets have been experimentally tested for their ability to fulfill QPCR quality requirements (12) on honeybee gut material by checking their specificity (by gel electrophoresis), linear dynamic range, efficiency and amplification reproducibility using 1:4 serial dilutions of gut DNA extracts.

QPCR were performed on a CFX96 Real-Time System Thermocycler (BioRad) in 96-well plates (Eurogentec RT-PL96-MQ) in a final volume of 20  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of 2X Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), 10 pmol of each primer (**Table 1**) and 2 to 24 ng of total genomic DNA. The PCR program consisted of an initial step at 94°C for 10 min, and 40 cycles comprising 25 s at 94°C, 25 s of annealing at 53°C and 25 s of elongation at 72°C. Treated and untreated samples from an identical replicate were always deposited on the same plate and all plates were duplicated. The specificity of the reactions was checked by analyzing the melting curves of the amplified products (Bio-Rad CFX Manager software). The obtained Cycle Quantification (C<sub>Q</sub>) values were proportional to the log of input DNA amounts.

In contrast to previous studies, where QPCR data were normalized to total DNA content or sample weight, we chose to use the total bacterial content as a reference. We thus avoided biases due to non-bacterial DNA, *e.g.* DNA from *N. ceranae* or the honeybee, and due to loss of material following dissection or defecation. The total bacterial DNA content was estimated by the mean of the C<sub>Q</sub> values obtained with both 341F/534R and BAC338F/BAC805R primer pairs (**Table 1**). Noteworthy the two pairs gave very similar C<sub>Q</sub> values (correlation coefficient of 0.985; n=197). For each taxonomic group the corresponding C<sub>Q</sub> was subtracted from the mean reference C<sub>Q</sub> of the same sample. Normalized C<sub>Q</sub> were then compared pairwise. The log<sub>2</sub> of the ratio of a taxonomic group in a treated condition relative to the untreated one was obtained by subtracting the normalized C<sub>Q</sub> of control from the normalized C<sub>Q</sub> of the treated sample from the same colony and sampling day. Statistical analyses were performed using PAST software (37).

# F.4. Results

Honeybees were exposed to the parasite *N. ceranae* or to low doses of the four neurotoxic insecticides. The daily sugar consumption was constant throughout the experiment and not significantly different between groups (**Suppl. Fig. S1**). Survival analyses showed a significant decrease in honeybee survival for both winter and summer honeybees infected with *N. ceranae* or exposed to the highest dose of fipronil (**Suppl. Fig. S2**). The four other insecticide treatments did not significantly reduce the honeybee survival.



Fig. 1. Comparison of the abundances of the major bacterial taxa in the gut microbiota between summer and winter honeybees: *Alphaproteobacteria* ( $\alpha$ -P), *Bifidobacterium* spp. (Bifi), *Lactobacillus* spp. (Lact), *Lactobacillus* Firm-5 clade only (Firm5), *Gammaproteobacteria* ( $\gamma$ -P), *Gilliamella apicola* (G.api), and *Snodgrassella alvi* (S.alvi1 and S.alvi2 using the primer pairs Neiss-F/Neiss-R and Beta-1009-qtF/Beta-1115-qtR, respectively). Interior worker honeybees were kept 18 days in cages (control conditions) before 16S rRNA gene quantification by QPCR in the hindgut. The y-axis represents the mean log2 of fold change (FC) in taxa abundance between summer and winter workers. Positive and negative values denote higher and lower abundance in summer bees compared to winter bees, respectively. Data were gathered from five independent colony-replicates. Bars represent the 95% confidence intervals. Stars indicate significant differences (p<0.05) performing paired Wilcoxon signed rank test.

In order to assess the abundance of the major bacterial taxa, published primer pairs targeting the 16S rRNA gene were checked for QPCR quality (**Table 1**). Ten primer pairs were eventually chosen that target: total bacteria (two pairs), *Alphaproteobacteria, Bifidobacteriaceae* (almost exclusively represented by *Bifidobacterium* spp. in the honeybee gut), *Lactobacillus* spp. with one pair recognizing all *Lactobacillus* spp. (including Firm-4, Firm-5 and *L. kunkeei* clades) and another the *Lactobacillus* Firm-5 clade only, *Gammaproteobacteria, G. apicola* species, and *S. alvi* species (two pairs, including one recognizing the *Neisseriaceae* that are almost exclusively represented by *S. alvi* in the honeybee microbiota). Principal component and ANOVA2 analyses suggested that season was the main factor explaining differences in the abundance of these taxa (**Suppl. Fig. S3**). More than 79% of the variance was explained by one principal component that seemed mainly linked to the season and partly to the treatments, especially to *N. ceranae* infection.

The abundance of the major bacterial taxa was first compared between summer and winter in untreated honeybees. *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus* Firm-5 and *Alphaproteobacteria* were significantly more abundant in winter while both *G. apicola* and *Gammaproteobacteria* were more abundant in summer (**Fig. 1**). The core microbiota of the gut was subjected to global seasonal variations.

The abundance of bacterial groups in honeybees chronically exposed to fipronil, imidacloprid, thiamethoxam or coumaphos was then compared to the untreated control (Fig. 2). Sublethal exposure to all insecticides induced a significant decrease in the relative abundance of Lactobacillus spp. in winter and in summer honeybees except for the treatment with the lower dose of fipronil (0.25  $\mu$ g/kg) for which the decrease was not significant in summer. The highest and lethal dose of fipronil (1 µg/kg) did not significantly change Lactobacillus spp. abundance. Similar results were obtained with the whole *Lactobacillus* spp. or the Firm-5 clade only. A significant decrease in the abundance of *Bifidobacterium* spp. was observed in response to imidacloprid and thiamethoxam in summer honeybees and to coumaphos and to the low dose of fipronil (0.25 µg/kg) in winter honeybees. The abundance of Bifidobacterium spp. was not affected by the lethal dose of fipronil. Chronic exposure to insecticides induced other significant variations but in winter honeybees only, with a decrease in the relative abundance of Alphaproteobacteria in response to thiamethoxam (Fig. 2A), an increase in G. apicola in response to thiamethoxam and 1 µg/kg fipronil (Fig. 2F), an increase in S. alvi in response to 1  $\mu$ g/kg fipronil using the *S. alvi* but not the *Neisseriaceae* specific primers (**Fig.** 2G, H). Altogether, these data showed similar effects of sublethal doses of insecticides that were more significant in winter honeybees.

*N. ceranae* infection induced variations in the proportion of all tested bacterial groups (**Fig. 2**). The abundances of *Alphaproteobacteria*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. were significantly decreased by the parasite whatever the season. Contrariwise, *Gammaproteobacteria*, *G. apicola*, and *S. alvi* significantly increased in winter honeybees only. Yet, one phylotype identified as *S. alvi* was less abundant in infected bees as shown by



Fig. 2. Abundance of the major taxa in the gut microbiota of pesticide-exposed or *N. ceranae*-infected honeybees compared to untreated honeybees. Interior worker honeybees were submitted to a chronic exposure to coumaphos 650  $\mu$ g/kg (COM), 1.7  $\mu$ g/kg thiamethoxam (TMX), 3.5  $\mu$ g/kg imidacloprid (IMI), 0.25  $\mu$ g/kg (FIP¼) or 1  $\mu$ g/kg fipronil (FIP1) or to an infection with *N. ceranae* (Ncer). Abundance of bacterial taxa was assessed by QPCR after 15 or 18 days in winter (white bars) and summer (hatched bars) honeybees. The y-axes depict the mean log2 of fold change (FC) in abundance between treated and untreated samples. Negative and positive values denote lower and higher abundance in response to stressors, respectively. Data were gathered from five independent colony-replicates. Bars represent the 95% confidence intervals. Stars indicate significant differences (p<0.05) performing paired Wilcoxon signed rank test.

Denaturating Gradient Gel Electrophoresis (**Suppl. Fig. S4**), suggesting a complex rebalancing of *S. alvi* strains in infected honeybees.

# F.5. Discussion

# F.5.1. Seasonality of the honeybee microbiota and of stressor-induced variations

The abundance of the main bacterial groups of the gut microbiome differed in summer and winter honeybees (**Fig. 1**). The higher abundance of *G. apicola* during the beekeeping season was already suggested by Ludvigsen *et al.* (57). In contrast to previous studies (21, 57) seasonal dynamics were also observed for *Alphaproteobacteria*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., which were less abundant in summer. As the honeybee gut microbiota is influenced by environmental landscape (42), it is logically influenced by season in temperate areas. Genomic data suggested that *G. apicola* participates in digestion through the breakdown of complex carbohydrates such as the pectin contained in pollen (29, 52). The increased abundance of *G. apicola* in summer could be related to the increase of such resources.

The response to stressors also differed according to the season (**Fig. 2**), with similar trends but with more significant results in winter. The mortality of honeybees exposed to acute neonicotinoid treatments was shown to be higher in winter than in summer (7). Here, we showed that the microbiota, and thus the holobiont are more sensitive in winter. The lack of significance in summer bees could be related to a higher heterogeneity in the microbial communities, reflected by a higher variance of data (**Fig. 2**, **Suppl. Fig. S3**) and a higher  $\alpha$ diversity (57). These could be explained by the greater diversity of resources in summer (25, 42). Moreover, short-living summer bees are more diverse in physiology, engaging agedependent division of labor with successive changes in endocrine system (73), and it is thought that the microbiota richness and abundance differ with ontogenetic stages and behavioral tasks (40, 43). In contrast, in February, aged overwintering bees are more homogeneous, clustering inside the hive and feeding on less diverse reserves.

# F.5.2. Alterations of the honeybee microbiota by the intestinal parasite *N. ceranae*

Pathogens can alter the honeybee microbiota composition (30, 35) and our data revealed that all major bacterial taxa were affected by *N. ceranae* (Fig. 2), with a drop in lactic acid bacteria (LABs), including *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp., and an increase in *S. alvi* and *G. apicola*. The increase of *S. alvi* and *G. apicola* could result from a rebalance of the microbiota by occupying niches left vacant by the LABs. The DGGE analysis suggested that while the whole *S. alvi* species experienced an increase in abundance, the content of a peculiar strain decreased. Such opposite variation in strain content was previously observed for *G. apicola* in response to antibiotic treatment, suggesting a variation in strains ability to

cope with stress (66). Such important dysbiosis was not observed in *A. mellifera* in previous studies (41, 55, 58). In the Asian honeybee *Apis cerana*, Li *et al.* (53) observed a similar decreased abundance of *Bifidobacterium* spp., but no significant change in *Lactobacillus* spp..

It is unlikely that *N. ceranae* directly affects the gut microbial communities as its development entirely occurs within the midgut epithelial cells. However, it can alter the honeybee midgut homeostasis. *N. ceranae* induces a degeneration of the midgut epithelium and peritrophic matrix (26, 39, 48) that could alter the activation of the immune system by luminal bacteria (38, 47). The infection also upregulates the antioxidant system, reduces the production of reactive oxygen species (ROS) (26, 65, 81, 82) and may provoke an immunosuppression by inhibiting the production of antimicrobial peptides (AMP) (3, 5, 16, 54). No data are available on the honeybee hindgut. Interestingly, the microsporidian parasite *Paranosema locustae* alters the gut microbiota of *Locusta migratoria* but also induces an acidification and an increase in ROS in the hindgut (74, 78). By affecting the gut ecosystem, possibly through changes in AMPs, ROS or pH, *N. ceranae* could favor or impair bacterial communities.

# F.5.3. Alterations of the honeybee gut microbiota by insecticides

Honeybees were chronically exposed to concentrations of insecticides that correspond to residue levels detected in hive matrices (18, 45, 51, 62), denoting realistic exposures. These treatments led to variations of the honeybee core microbiota taxa, with a general decrease in LABs (**Fig. 2**). Kakumanu *et al.* (44) also observed a significant decrease in *Lactobacillus* spp. in response to the fungicide chlorothalonil but a slight increase in *Bifidobacterium* spp. in response to coumaphos. Such opposite variation of *Bifidobacterium* spp. suggested a great influence of the mode of exposure (an oral exposure in cages *vs* an in-hive CheckMite+<sup>®</sup> treatment) on the microbial response. In contrast to our results, Raymann *et al.* (68) observed no significant effect of imidacloprid on the microbiota. The 1.0 µg/kg fipronil treatment had not a stronger effect on LABs than the 0.25 µg/kg treatment but induced an increase in *G. apicola* and *S. alvi* in winter (**Fig. 2**). This higher insecticide concentration was lethal and there was a probable strong effect of the morbidity on the microbiota since dying honeybees could have been sampled.

Insecticides may have a direct impact on bacterial growth that strongly varies upon insecticides and bacterial strains (75). Thus, it seems unlikely that insecticides from different families have the same direct impact on the gut bacteria. The similar effects observed in response to different insecticides (**Fig. 2**) may be due to aspecific changes in the gut homeostasis that would secondarily affect the microbiota. In the midgut, a chronic and oral exposure to insecticides altered the immune system, induced the antioxidant defenses and provoked damages in the epithelial cells (5, 9, 15, 20, 31, 68). Thus, the gut bacterial communities may have to cope with changes in their environment.

Ingested neurotoxic insecticides are absorbed in the gut and diffuse in the whole insect body (76), eventually affecting the nervous system (14). Neonicotinoids, such as thiamethoxam and imidacloprid, induce morphological, cytological and transcriptomic alterations in the brain,

and disrupt the hormonal balance (20). Thus, besides local effects on the gut, insecticides have pleiotropic effects that could in turn affect the gut and its microbiota, whom is thought to be connected to the nervous system in mammals (69). Such indirect impact on the gut have been demonstrated on the midgut antioxidant activities following a single topical exposure to fipronil (13).

# F.5.4. A dysbiosis may sensitize the honeybee to other stressors

The microbiota is known to protect the host against pathogens, through the stimulation of the immune system and the competition for niche occupation (36). The honeybee gut microbiota is thought to induce AMPs production and the LABs themselves exhibit antibacterial properties (50, 67, 80). The suppression of honeybee gut bacteria by antibiotics increased the honeybee vulnerability to *N. ceranae* (55) and some bacteria, including LABs, may conversely reduce the parasite proliferation (22, 27). In contrast, feeding supplementation with *S. alvi* increased the honeybee sensitivity to the trypanosomal parasite *Lotmaria passim* (72).

The insect microbiota may also comprise strains able to enhance the host resistance to insecticides (84). In the moth *Plutella xylostella* a positive correlation has been observed between *Lactobacillales* abundance and fipronil resistance. Moreover, some gut bacteria isolated from insects, including *Lactobacillus* spp., are thought to metabolize insecticides (1, 24). Thus, a dysbiosis, and especially a reduction of LABs, could sensitize the honeybee to both pathogens and pesticides.

The seasonal-dependent gut microbiota can be seen as a modulator of the interactions between the honeybee and its stressors, emphasizing the need to consider the holobiont, *i.e.* the insect and its symbionts, both in summer and winter, when assessing the effects of stressors.



Β.

Condition		FIP¼	COM	TMX	IMI	FIP1
		fipronil 0.25 ng/g	coumaphos 650 ng/g	thiamethoxam 1.7 ng/g	imidacloprid 3.5 ng/g	fipronil 1.0 ng/g
Consumption (ng/bee/day) ± IC95	Winter honeybees	0.0074 ± 0.0003	20.69 ± 0.87	0.053 ± 0.002	0.114 ± 0.003	0.030 ± 0.002
	Summer honeybees	0.0089 ± 0.0006	23.68 ± 1.51	0.067 ± 0.004	0.127 ± 0.006	0.030 ± 0.002
LD50 (ng/bee)		5	4630	15	28	5
Consumption (fraction of LD50/bee/day)	Winter honeybees	1:679	1:224	1:282	1:245	1:167
	Summer honeybees	1:560	1:194	1:222	1:221	1:164

Supplementary Figure S1. Sucrose (A) and insecticide (B) consumption of honeybees chronically exposed to insecticides or infected with *Nosema ceranae*. Insecticides were added in the feeding sugar syrup *ad. lib.*, and spores of *N. ceranae* were orally administrated to the honeybees at the beginning of the experiment. Control bees were not exposed to any stressor. (A) Mean daily sugar consumption in winter (left panel) and summer (right panel) honeybees. Bars represent the 95% confidence intervals. No significant difference was observed. (B) Mean daily consumption of insecticides and comparison with the oral LD50 given by Mullin *et al.* (62).



Supplementary Figure S2. Cumulative proportion of surviving honeybees chronically exposed to insecticides (A-E) or infected with spores of *Nosema ceranae* (F) in winter (red) or summer (yellow) compared to untreated control in winter (blue) or summer (green). Insecticides were added in the feeding sugar syrup, and spores of *N. ceranae* were orally administrated at the beginning of the experiment. Control bees were not exposed to any stressor. Survival proportion was estimated using the Kaplan-Meier method. Thick curves represent the mean values from five colony replicates (n = 5 with 66 to 74 bees per replicate and per condition at day 0) and the thin curves represent the amplitude of the standard error. Log rank  $\chi^2$  tests using data from single colony replicates showed significant effects (*p*<0.005) of 0.25 ng/g fipronil on one colony in winter, of coumaphos on one colony in summer, and of imidacloprid on two colonies in summer. As these effects were clearly not reproduced among replicates, they were considered as not significant. Only the decrease of survival in infected bees (F) and in bees submitted to 1 ng/g fipronil (B) was significant in all colony replicates (with  $\chi^2$ >9.1 and *p*<0.0025), and thus considered as globally significant (\*).



**Supplementary Figure S3. Principal component analysis of QPCR data.** Analyses were performed using the normalized Cq to total bacterial content in all **(A)** or in summer (filled signs, **B)** or in winter (empty signs, **C)** honeybees. In order to avoid redundant data for the same taxa, only values obtained for all *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Alphaproteobacteria*, *G. apicola* and *S. alvi* were included. Almost identical results were obtained exchanging primer pairs data for a similar taxon. In **A** more than 79% of the variance explained by one principal component that seemed mainly linked to the season. In **B** and **C**, only control and *N. ceranae* observations were clearly separated. In all analyses, only the first component was significant (broken stick model). Two-ways ANOVA (not shown) revealed significant effect of season for all taxa except *Neisseriaceae* and *S. alvi* (in accordance with Fig.1), and significant effect of treatment in accordance with the Fig. 2.

A. Bacteria

# Col. A Col. B Col. C Ctrl Inf Ctrl Inf Ctrl Inf

B. Neisseriaceae



Supplementary Figure S4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) profiles of total bacterial (A) and Neisseriaceae-specific (B) 16S rDNA fragments present in the gut microbiota from uninfected and N. ceranae-infected honeybees. Winter honeybees from three colonies (Col. A, Col. B, Col. C) were infected with N. ceranae spores (Inf.) or not infected (Ctrl). 5 or 6 bees per condition and per replicate were sacrificed after 22 days. Their gut was dissected and the total DNA was extracted as described in the main article. The V3-V5 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified using GC-338F (5'-CGCCCGCCGCGC-GCGGCGGGCGGGGGGGGGGGCACGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') and 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCT-GG-3') primers (3) following PCR conditions described by Mrázek et al. (2). The V6 region of Neisseiriaceae, including S. alvi, 16S rRNA gene was amplified using GC-968F (5'-CGCCCGGGGCGCGCGCGGGGGGGGGGGGGG-GGGGCACGGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3' from Crouzet et al. (1)) and Beta-1115-gtR (Table 1) primers following PCR conditions described by Crouzet et al. (1). 300 ng of amplification products were separated on 9% polyacrylamide gels with 35–60 % denaturing gradient of 7 M urea and 40 % formamide (V/V) as in Mrázek et al. (2). Gels were stained using GelStar dye (Lonza) and visualized on UV light on UV Biospectrum<sup>®</sup> Imaging System<sup>™</sup> (UVP). Nine bands of interest (arrows) were excised from the gel and cloned into pGEM®-T Vector (Promega). The inserts of 3 or 4 clones per band were sequenced (Eurofins Genomics). Two bacterial phylotypes (A) were associated to N. ceranae infection (empty and filled triangles). Their identification was not possible as they were mixtures of several species including S. alvi, Lactobacillus spp., Providencia spp., Bartonella spp., G. apicola and F. perrara. The neisseriacean phylotype (arrows in **B**) was attributed to *S. alvi* (>80% of obtained sequences with >99% identity, accession number MH936011) and was associated with uninfected bees (arrow) in the three colony-replicates.

#### **References :**

- 1. Crouzet *et al.* 2010. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. Soil Biol. Biochem. 42:193–202.
- 2. Mrázek et al. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. Folia Microbiol. 53:229–233.
- 3. Muyzer, G. 1993. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59:695–700.

# F.6. Acknowledgements and references

#### Acknowledgements :

The project was funded by the ANR MIXTRESS program (ANR-15-CE34-0004). The authors are thankful to Jérôme Lesobre, Johan Panek and Laurianne Paris for their support in beekeeping activities and to Clermont Auvergne Métropole for lending a beehive site. The authors declare no conflict of interest.

#### **References :**

- Almeida, L.G. de, L.A.B. de Moraes, J.R. Trigo, C. Omoto, and F.L. Cônsoli. 2017. The gut microbiota of insecticideresistant insects houses insecticide-degrading bacteria: a potential source for biotechnological exploitation. PLoS ONE. 12:e0174754.
- Anderson, K.E., T.H. Sheehan, B.M. Mott, P. Maes, L. Snyder, M.R. Schwan, A. Walton, B.M. Jones, and V. Corby-Harris. 2013. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). PLOS ONE. 8:e83125.
- Antúnez, K., R. Martín-Hernández, L. Prieto, A. Meana, P. Zunino, and M. Higes. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). Environ. Microbiol. 11:2284– 2290.
- Aufauvre, J., D.G. Biron, C. Vidau, R. Fontbonne, M. Roudel, M. Diogon, B. Viguès, L.P. Belzunces, F. Delbac, and N. Blot. 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. Sci. Rep. 2:326.
- Aufauvre, J., B. Misme-Aucouturier, B. Viguès, C. Texier, F. Delbac, and N. Blot. 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. PLoS ONE. 9:e91686.
- Bacchetti De Gregoris, T., N. Aldred, A.S. Clare, and J.G. Burgess. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. J. Microbiol. Methods. 86:351–356.
- Baines, D., E. Wilton, A. Pawluk, M. de Gorter, and N. Chomistek. 2017. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. Sci. Rep. 7:10979.
- Beyer, M., A. Lenouvel, C. Guignard, M. Eickermann, A. Clermont, F. Kraus, and L. Hoffmann. 2018. Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee colonies—a case study from Luxembourg. Environ. Sci. Pollut. Res. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3187-4.
- Boncristiani, H., R. Underwood, R. Schwarz, J.D. Evans, J. Pettis, and D. vanEngelsdorp. 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. J. Insect. Physiol. 58:613–620.
- Bonmatin, J.-M., C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D.P. Kreutzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro, E.A.D. Mitchell, D.A. Noome, N. Simon-Delso, and A. Tapparo. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Environ. Sci. Pollut. Res. 22:35–67.
- Bru, D., F. Martin-Laurent, and L. Philippot. 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16s rRNA gene as an example. Appl. Environ. Microbiol. 74:1660–1663.
- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, and C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. Clin. Chem. 55:611–622.
- Carvalho, S.M., L.P. Belzunces, G.A. Carvalho, J.-L. Brunet, and A. Badiou-Beneteau. 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.
- Casida, J.E., and K.A. Durkin. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. Annu. Rev. Entomol. 58:99–117.
- Catae, A.F., T.C. Roat, M. Pratavieira, A.R. da Silva Menegasso, M.S. Palma, and O. Malaspina. 2018. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Ecotoxicology. 27:109–121.
- Chaimanee, V., P. Chantawannakul, Y. Chen, J.D. Evans, and J.S. Pettis. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. J. Insect. Physiol. 58:1090–1095.
- Charreton, M., A. Decourtye, M. Henry, G. Rodet, J.-C. Sandoz, P. Charnet, and C. Collet. 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. PLoS ONE. 10:e0144879.
- Chauzat, M.-P., J.-P. Faucon, A.-C. Martel, J. Lachaize, N. Cougoule, and M. Aubert. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. J. Econ. Entomol. 99:253–262.
- Chauzat, M.-P., A. Jacques, EPILOBEE Consortium, M. Laurent, S. Bougeard, P. Hendrikx, and M. Ribière-Chabert. 2016. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. Apidologie. 47:348–378.

- Christen, V., F. Mittner, and K. Fent. 2016. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). Environ. Sci. Technol. 50:4071–4081.
- Corby-Harris, V., P. Maes, and K.E. Anderson. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. PLoS ONE. 9:e95056.
- Corby-Harris, V., L. Snyder, C. a. D. Meador, R. Naldo, B. Mott, and K.E. Anderson. 2016. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. J. Econ. Entomol. 109:537–543.
- Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P.-L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis, and W.I. Lipkin. 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. Science. 318:283–287.
- Daisley, B.A., M. Trinder, T.W. McDowell, S.L. Collins, M.W. Sumarah, and G. Reid. 2018. Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent lactobacilli interactions in a *Drosophila melanogaster* insect model. Appl. Environ. Microbiol. 84:e02820-17.
- Danner, N., A. Keller, S. Härtel, and I. Steffan-Dewenter. 2017. Honey bee foraging ecology: Season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. PLoS ONE. 12:e0183716.
- Dussaubat, C., J.-L. Brunet, M. Higes, J.K. Colbourne, J. Lopez, J.-H. Choi, R. Martín-Hernández, C. Botías, M. Cousin, C. McDonnell, M. Bonnet, L.P. Belzunces, R.F.A. Moritz, Y. Le Conte, and C. Alaux. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. PLoS ONE. 7:e37017.
- El Khoury, S., A. Rousseau, A. Lecoeur, B. Cheaib, S. Bouslama, P.-L. Mercier, V. Demey, M. Castex, P. Giovenazzo, and N. Derome. 2018. Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administrating either endogenous or allochthonous gut microbiota strains. Front. Ecol. Evol. 6:58.
- Engel, P., R.R. James, R. Koga, W.K. Kwong, Q.S. McFrederick, and N.A. Moran. 2013. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. J. Apic. Res. 52:1–24.
- Engel, P., and N.A. Moran. 2013. Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. Gut Microbes. 4:60–65.
- Erban, T., O. Ledvinka, M. Kamler, B. Hortova, M. Nesvorna, J. Tyl, D. Titera, M. Markovic, and J. Hubert. 2017. Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. PeerJ. 5:e3816.
- Garrido, P.M., M.P. Porrini, K. Antúnez, B. Branchiccela, G.M.A. Martínez-Noël, P. Zunino, G. Salerno, M.J. Eguaras, and E. Ieno. 2016. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. Vet. Res. 47:51.
- Godfray, H.C.J., T. Blacquiere, L.M. Field, R.S. Hails, G. Petrokofsky, S.G. Potts, N.E. Raine, A.J. Vanbergen, and A.R. McLean. 2014. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. Proc. R. Soc. B. 281:20140558.
- Godfray, H.C.J., T. Blacquière, L.M. Field, R.S. Hails, S.G. Potts, N.E. Raine, A.J. Vanbergen, and A.R. McLean. 2015. A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. Proc. R. Soc. B. 282:20151821.
- Goulson, D., E. Nicholls, C. Botias, and E.L. Rotheray. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 347:1255957–1255957.
- Guo, J., J. Wu, Y. Chen, J.D. Evans, R. Dai, W. Luo, and J. Li. 2015. Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees, *Apis cerana*. J. Invertebr. Pathol. 127:110–114.
- Hamdi, C., A. Balloi, J. Essanaa, E. Crotti, E. Gonella, N. Raddadi, I. Ricci, A. Boudabous, S. Borin, A. Manino, C. Bandi, A. Alma, D. Daffonchio, and A. Cherif. 2011. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. J. Appl. Entomol. 135:524–533.
- Hammer, O., D.A.T. Harper, and P.D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electronica. 4:9.
- Hegedus, D., M. Erlandson, C. Gillott, and U. Toprak. 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. Annu. Rev. Entomol. 54:285–302.
- Higes, M., A. Meana, C. Bartolomé, C. Botías, and R. Martín-Hernández. 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen: *N. ceranae* an emergent pathogen for beekeeping. Environ. Microbiol. Rep. 5:17–29.
- Hroncova, Z., J. Havlik, J. Killer, I. Doskocil, J. Tyl, M. Kamler, D. Titera, J. Hakl, J. Mrazek, V. Bunesova, and V. Rada. 2015. Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PLoS ONE. 10:e0118707.
- Hubert, J., M. Bicianova, O. Ledvinka, M. Kamler, P.J. Lester, M. Nesvorna, J. Kopecky, and T. Erban. 2017. Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. Microb. Ecol. 73:685–698.
- Jones, J.C., C. Fruciano, F. Hildebrand, H.A. Toufalilia, N.J. Balfour, P. Bork, P. Engel, F.L. Ratnieks, and W.O. Hughes. 2018. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. Ecol. Evol. 8:441–451.
- Jones, J.C., C. Fruciano, J. Marchant, F. Hildebrand, S. Forslund, P. Bork, P. Engel, and W.O.H. Hughes. 2018. The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. Insectes Soc. 65:419–429.

- Kakumanu, M.L., A.M. Reeves, T.D. Anderson, R.R. Rodrigues, and M.A. Williams. 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. Front. Microbiol. 7:1255.
- Kasiotis, K.M., C. Anagnostopoulos, P. Anastasiadou, and K. Machera. 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. Sci. Total Environ. 485–486:633–642.
- Klindworth, A., E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, and F.O. Glöckner. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41:e1.
- Kuraishi, T., O. Binggeli, O. Opota, N. Buchon, and B. Lemaitre. 2011. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108:15966–15971.
- Kurze, C., Y. Le Conte, P. Kryger, O. Lewkowski, T. Müller, and R.F.A. Moritz. 2018. Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. J. Invertebr. Pathol. 154:1–4.
- Kwong, W.K., and N.A. Moran. 2016. Gut microbial communities of social bees. Nat. Rev. Microbiol. 14:374–384.
- Kwong, W.K., A.L. Mancenido, and N.A. Moran. 2017. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R. Soc. open sci. 4:170003.
- Lambert, O., M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, M. L'Hostis, L. Wiest, A. Buleté, F. Delbac, and H. Pouliquen. 2013. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. PLoS ONE. 8:e67007.
- Lee, F.J., D.B. Rusch, F.J. Stewart, H.R. Mattila, and I.L.G. Newton. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome: Fermentation by honey bee gut microbes. Environ. Microbiol. 17:796–815.
- Li, J., H. Qin, J. Wu, B.M. Sadd, X. Wang, J.D. Evans, W. Peng, and Y. Chen. 2012. The prevalence of parasites and pathogens in Asian honeybees *Apis cerana* in China. PLoS ONE. 7:e47955.
- Li, W., J.D. Evans, J. Li, S. Su, M. Hamilton, and Y. Chen. 2017. Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. Parasitol. Res. 116:3265–3274.
- Li, J.H., J.D. Evans, W.F. Li, Y.Z. Zhao, G. DeGrandi-Hoffman, S.K. Huang, Z.G. Li, M. Hamilton, and Y.P. Chen. 2017. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. PLoS ONE. 12:e0187505.
- Lu, K., R. Mahbub, and J.G. Fox. 2015. Xenobiotics: Interaction with the intestinal microflora. ILAR J. 56:218–227.
- Ludvigsen, J., A. Rangberg, E. Avershina, M. Sekelja, C. Kreibich, G. Amdam, and K. Rudi. 2015. Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. Microbes Environ. 30:235–244.
- Maes, P.W., P.A.P. Rodrigues, R. Oliver, B.M. Mott, and K.E. Anderson. 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema disease* in the honeybee (*Apis mellifera*). Mol. Ecol. 25:5439–5450.
- Martinson, V.G., B.N. Danforth, R.L. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek, and N.A. Moran. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees: the microbiota of honey bees and bumble bees. Molecular Ecology. 20:619–628.
- Martinson, V.G., J. Moy, and N.A. Moran. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Appl. Environ. Microbiol. 78:2830–2840.
- Moran, N.A., A.K. Hansen, J.E. Powell, and Z.L. Sabree. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE. 7:e36393.
- Mullin, C.A., M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. vanEngelsdorp, and J.S. Pettis. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. PLoS ONE. 5:e9754.
- Oliveira, R.A., T.C. Roat, S.M. Carvalho, and O. Malaspina. 2014. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenopptera: Apidae). Environ. Toxicol. 29:1122–1133.
- Panek, J., L. Paris, D. Roriz, A. Mone, A. Dubuffet, F. Delbac, M. Diogon, and H. El Alaoui. 2018. Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.09.007.
- Paris, L., M. Roussel, B. Pereira, F. Delbac, and M. Diogon. 2017. Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. Microb. Biotechnol. 10:1702–1717.
- Raymann, K., L.-M. Bobay, and N.A. Moran. 2018. Antibiotics reduce genetic diversity of core species in the honeybee gut microbiome. Mol. Ecol. 27: 2057–2066.
- Raymann, K., and N.A. Moran. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. Curr. Opin. Chem. Biol. 26:97–104.
- Raymann, K., E.V.S. Motta, C. Girard, I.M. Riddington, J.A. Dinser, and N.A. Moran. 2018. Imidacloprid decreases honey bee survival but does not affect the gut microbiome. Appl. Environ. Microbiol. 84:e00545-18.
- Rhee, S.H., C. Pothoulakis, and E.A. Mayer. 2009. Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 6:306–314.
- Rinttilä, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogius, and A. Palva. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNAtargeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 97:1166–1177.

- Ryu, J.-H., S.-H. Kim, H.-Y. Lee, J.Y. Bai, Y.-D. Nam, J.-W. Bae, D.G. Lee, S.C. Shin, E.-M. Ha, and W.-J. Lee. 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. Science. 319:777–782.
- Schwarz, R.S., N.A. Moran, and J.D. Evans. 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113:9345–9350.
- Seeley, T.D. 1985. Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Shi, W., Y. Guo, C. Xu, S. Tan, J. Miao, Y. Feng, H. Zhao, R.J. St. Leger, and W. Fang. 2014. Unveiling the mechanism by which microsporidian parasites prevent locust swarm behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111:1343–1348.
- Staley, Z.R., V.J. Harwood, and J.R. Rohr. 2015. A synthesis of the effects of pesticides on microbial persistence in aquatic ecosystems. Crit. Rev. Toxicol. 45:813–836.
- Suchail, S., G.D. Sousa, R. Rahmani, and L.P. Belzunces. 2004. *In vivo* distribution and metabolisation of 14Cimidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. Pest. Manag. Sci. 60:1056–1062.
- Suzuki, M.T., L.T. Taylor, and E.F. Delong. 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. Appl. Environ. Microbiol. 66:4605–4614.
- Tan, S., K. Zhang, H. Chen, Y. Ge, R. Ji, and W. Shi. 2015. The mechanism for microsporidian parasite suppression of the hindgut bacteria of the migratory locust *Locusta migratoria manilensis*. Sci. Rep. 5:17365.
- vanEngelsdorp, D., and M.D. Meixner. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J. Invertebr. Pathol. 103:S80–S95.
- Vásquez, A., E. Forsgren, I. Fries, R.J. Paxton, E. Flaberg, L. Szekely, and T.C. Olofsson. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE. 7:e33188.
- Vidau, C., M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Viguès, J.-L. Brunet, C. Texier, D.G. Biron, N. Blot, H. El Alaoui, L.P. Belzunces, and F. Delbac. 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. PLoS ONE. 6:e21550.
- Vidau, C., J. Panek, C. Texier, D.G. Biron, L.P. Belzunces, M. Le Gall, C. Broussard, F. Delbac, and H. El Alaoui. 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. J. Invertebr. Pathol. 121:89–96.
- Vojvodic, S., S.M. Rehan, and K.E. Anderson. 2013. Microbial Gut Diversity of Africanized and European Honey Bee Larval Instars. PLoS ONE. 8:e72106.
- Xia, X., B. Sun, G.M. Gurr, L. Vasseur, M. Xue, and M. You. 2018. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). Front. Microbiol. 9:25.
- Xu, L.-L., J. Wu, J. Guo, and J.-L. Li. 2014. Dynamic variation of symbionts in bumblebees during hosts growth and development. Sci. Sin. B. 47:2030–2037.
- Yu, Y., C. Lee, J. Kim, and S. Hwang. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Bioeng. 89:670–679.



Log<sub>2</sub> du ratio de l'abondance relative par rapport au contrôle

1

2

0

Supplementary Figure S5. Abondance relative de taxa majoritaires du microbiote en réponse à *N. ceranae* et à trois insecticides chez des abeilles émergentes. Des abeilles émergentes prélevées en été ont été infectées avec des spores de *N. ceranae* (en moyenne 120 000 spores/ab, en rose) (A) ou intoxiquées avec du coumaphos (650 ng/g de sirop de saccharose OC, en bleu), du thiaméthoxame (1,5 ng/g OC, en orangé) ou de l'imidaclopride (3,5 ng/g OC, en rouge) (B). Les abondances ont été évaluées par QPCR après 15 jours. Les abondances moyennes ont été calculées par rapport aux contrôles non traités (n=5 colonies). L'échelle est logarithmique de base 2 (par exemple un  $log_2$  de -1 indique une abondance 2 fois moindre que dans la condition contrôle). Les barres représentent l'intervalle de confiance à 95% et les étoiles une différence significative par rapport au contrôle (Mann-Whitney, n=5, p<0.05).

-2

-1

# F.7. Informations supplémentaires

# F.7.1. Autres résultats

# F.7.1.1. Le microbiote des abeilles émergentes serait plus affecté

Lors d'expérimentations préliminaires, l'abondance des groupes bactériens majoritaires étudiés dans l'article avait été quantifiée sur des abeilles d'été prélevées à leur émergence. Pour rappel, dans l'article il s'agissait d'abeilles d'intérieur d'âge variable, voire toutes âgées en hiver. Le développement d'un microbiote intestinal stable chez les ouvrières adultes se fait dans les six premiers jours suivant l'émergence (*cf.* B.3.2; Powell *et al.,* 2014). L'application de contaminants sur des abeilles émergentes permet donc de voir leurs effets sur un microbiote en installation, ce qui paraissait peu comparable aux effets décrits dans la publication sur un microbiote déjà installé.

Cependant, les résultats obtenus avec l'infection par *N. ceranae* ou l'intoxication chroniques aux insecticides des abeilles émergentes ne sont pas très différents (**Suppl. Fig. S5**). Ils ont montré un impact significatif de l'infection, avec une forte diminution des bactéries lactiques (LAB, *lactic acid bacteria*), comprenant ici les *Lactobacillus* et des *Bifidobacterium*, une diminution des Alphaprotéobactéries et une augmentation des Gammaprotéobactéries. Concernant les insecticides, les résultats les plus significatifs concernent le coumaphos et le thiaméthoxame qui ont induit une diminution de l'abondance des LAB.

Ces données montrent que le microbiote en installation des ouvrières émergentes est au moins autant impacté que le microbiote stable des abeilles plus âgées. L'impact de *N. ceranae* sur les LAB pourrait même être plus important chez les émergentes, avec une baisse qui parait plus forte par rapport au contrôle non infecté (**Suppl. Fig. S5** *vs* **Fig. 2**).

# F.7.1.2. Le glyphosate affecte aussi le microbiote intestinal de l'abeille

Les couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR quantitative ont nécessité un travail préparatoire. La spécificité, la reproductibilité, la linéarité et l'efficacité de l'amplification ont été vérifiées en utilisant des dilutions en série d'un échantillon représentatif d'ADN complémentaire. Il s'agissait de valider les couples d'amorces et fournir les informations considérées comme nécessaires pour une publication (Bustin *et al.,* 2009). Un couple, pourtant publié, n'a d'ailleurs pas été validé.

La méthodologie mise au point a alors été appliquée pour étudier un autre facteur de stress : le glyphosate. En tant qu'herbicide, le glyphosate semble moins un facteur à risque pour les abeilles que les insecticides. Cependant, sa cible moléculaire, l'EPSP synthase, bien qu'absente chez les insectes, est présente chez nombre de bactéries. Son impact sur le microbiote de l'abeille a donc été étudié en utilisant la même approche que dans la
publication précédente. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue PLoS ONE (Blot *et al.,* 2019, *cf.* Annexe).

Des abeilles d'intérieur ont été prélevées de colonies et placées en cagettes. Elles ont été exposées de façon chronique et par voie orale au glyphosate et à son principal métabolite, l'AMPA. Après 11 j d'exposition, le glyphosate, mais pas l'AMPA, a induit une forte diminution de l'abondance de *S. alvi*. Des souches bactériennes isolées de l'intestin de l'abeille ont été soumises à des concentrations croissantes de glyphosate, montrant la sensibilité de *S. alvi* à l'herbicide. Le glyphosate aurait ainsi un effet inhibiteur direct sur la croissance de cette espèce bactérienne. Enfin, une co-exposition au glyphosate et à *N. ceranae* n'a pas montré d'interaction entre les deux facteurs de stress sur la mortalité de l'abeille.

#### F.7.2. Quelques nouveaux éléments de discussion

L'impact de *N. ceranae* sur le microbiote d'*A. mellifera,* montré ici pour la première fois, contrastait avec des travaux précédents, où le parasite n'avait que peu ou pas d'effet (Maes *et al.,* 2016 ; Hubert *et al.,* 2017), mais a été conforté depuis (Rubanov *et al.,* 2019 ; Paris *et al.,* 2020). Toutefois, Rubanov *et al.* (2019) ont observé une réponse variable de *G. apicola* en réponse au parasite, avec une diminution de son abondance lors d'une infection légère (faible charge parasitaire) et une augmentation lors d'une infection forte.

#### F.7.2.1. La variation saisonnière dépendrait d'autres facteurs comme les ressources

Depuis la publication de l'article, quelques autres publications se sont intéressées aux variations du microbiote intestinal. Kešnerová *et al.* (2020) ont montré une variation de l'abondance des communautés bactériennes, mais aussi de leur diversité, selon la saison et selon l'âge des ouvrières. L'abondance absolue du microbiote intestinal était plus importante chez les abeilles d'hiver, avec une augmentation des LAB et du genre *Bartonella*. La diversité en espèces bactériennes était quant à elle plus faible que chez les butineuses en saison apicole. Les résultats différaient donc avec ceux de notre article et ceux de Ludvigsen *et al.* (2015).

Ces variations pourraient dépendre, du moins en partie, du régime alimentaire des différentes abeilles échantillonnées. En effet, l'apport de pollen augmenterait l'abondance absolue de la plupart des groupes bactériens (Kešnerová *et al.,* 2020), tandis que des apports en miel, en saccharose ou en fructose affecteraient différemment l'abondance relative de ces mêmes groupes (Wang *et al.,* 2020). La variation du microbiote en fonction de la saison ferait donc intervenir de multiples facteurs difficilement discriminables.

#### F.7.2.2. Le microbiote pourrait récupérer des perturbations induites par les néonicotinoïdes

Une exposition de 7 j au thiaclopride (0,6 et 2,0 mg.L<sup>-1</sup> OC) induit une diminution de l'abondance absolue de l'ensemble des bactéries, et de l'abondance de *Lactobacillus* Firm-5 et de l'Alphaprotéobactérie *Bombella apis* (Liu *et al.,* 2020), complétant et confirmant en

partie nos résultats obtenus avec d'autres néonicotinoïdes. Le thiaclopride induit par ailleurs une diminution de la diversité bactérienne. En revanche, ces modifications n'ont pas été observées après 13 jours de traitement, malgré un impact significatif du thiaclopride sur la mortalité, suggérant un rétablissement du microbiote chez les abeilles survivantes.

## **G.** EFFECTS OF BINARY OR TERNARY MIXTURES CONTAINING THE PARASITE *NOSEMA CERANAE* AND INSECTICIDES FORMULATIONS ON THE HONEYBEE

Régis Rouzé<sup>1</sup>, Anne Moné<sup>1</sup>, Sylvie Tchamitchian<sup>2</sup>, Frédéric Delbac<sup>1</sup>, Olivier Esnault<sup>3,4</sup>, Hélène Delatte<sup>4</sup>, Luc Philippe Belzunces<sup>2</sup> et Nicolas Blot<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", F-63000 Clermont–Ferrand, France.
- <sup>2</sup> INRA, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, UR 406 A&E, CS 40509, 84914 Avignon, France.
- <sup>3</sup> GDS Réunion, La Plaine des Cafres, Ile de La Réunion, France
- <sup>4</sup> CIRAD, UMR PVBMT, Pôle de Protection des Plantes, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion, France
- <sup>\*</sup> Corresponding author. Dr. N. Blot, LMGE, Campus des Cézeaux, 1 Impasse Amélie Murat, TSA 60026, 63178 Aubière Cedex, France. Phone: (+33) 4 73 40 74 57. Email: *nicolas.blot@uca.fr*

*Running title*: *Nosema*-insecticides mixtures in honeybee *Keywords* : parasite, insecticide formulation, interaction, honeybee, mid-gut

## G.1. Résumés

#### G.1.1. Résumé en français

Les abeilles sont exposées à de nombreux facteurs de stress. Parmi les contaminants les plus fréquemment retrouvés dans les colonies figurent le parasite intestinal Nosema ceranae et les insecticides neurotoxiques. Les butineuses sont particulièrement exposées à ces derniers lors des activités de butinage, en particulier lorsque des formulations d'insecticides sont pulvérisées sur les cultures. Certaines de ces formulations peuvent en outre comprendre plusieurs insecticides. Afin d'évaluer si et comment les insecticides et le parasite interagissent, des abeilles ont été infectées avec des spores de N. ceranae, puis exposées par pulvérisation à des doses environnementales de Proteus® (s.a. deltaméthrine et thiaclopride). Dans une deuxième expérience, le Decis<sup>®</sup> (s.a. deltaméthrine) et le Calypso<sup>®</sup> (s.a. thiaclopride), seuls ou en combinaison, ont été appliqués sur des abeilles infectées ou non infectées. L'application d'insecticides par contact et l'infection à N. ceranae ont affecté la survie des abeilles respectivement à court et à long terme. Le Proteus® et N. ceranae ont modifié le transcriptome de l'intestin moyen des abeilles plus intensément lorsqu'ils étaient combinés. Les deux facteurs de stress ont modulé l'expression des gènes liés à l'immunité, à la détoxification, à l'intégrité de l'épithélium, à l'intégrité des synapses, au métabolisme lipidique et au cycle cellulaire, surtout s'ils sont combinés dans les deux derniers cas. Les gènes impliqués dans l'intégrité musculaire et le métabolisme énergétique ont été régulés en

réponse à la formulation et au parasite respectivement. La combinaison de Proteus<sup>®</sup> et de *N. ceranae* a spécifiquement modifié l'expression des gènes liés au système ubiquitineprotéasome et à la phosphorylation oxydative. Les deux facteurs de stress ont affecté l'activité des enzymes à la fois dans l'intestin moyen et dans le cerveau, montrant un impact sur des organes différents des sites d'exposition. Les données ont montré une réponse systémique de l'abeille et ont suggéré un rôle clé du turnover des protéines et de la respiration dans l'interaction parasite-insecticide.

#### G.1.2. Abstract

Honeybees are commonly exposed to a variety of stressors. Among of the most frequents contaminants of the colonies are the intestinal parasite Nosema ceranae and the neurotoxic insecticides. Foragers are particularly exposed to the later during foraging, especially to insecticides formulations sprayed on cultures. Some of these formulations may also include two insecticides. In order to assess whether and how the insecticides and the parasite interact, honeybees were infected with N. ceranae spores and then exposed to environmental doses of Proteus® (a.i. deltamethrin and thiacloprid) by spraying. In a second experiment Decis<sup>®</sup> (a.i. deltamethrin) and Calypso<sup>®</sup> (a.i. thiacloprid), alone or in combination, were applied on infected or uninfected honeybees. Contact application of insecticides and N. ceranae infection affected the honeybee survival at short and long term respectively. Proteus® and N. ceranae altered the honeybee midgut transcriptome more intensely when combined. Both stressors modulated the expression of genes linked to immunity, detoxification, epithelium integrity, synapse integrity, lipid metabolism and cell cycle, especially if combined in the two later cases. Genes involved in muscle integrity and energy metabolism were regulated in response to the formulation and the parasite respectively. The combination of Proteus<sup>®</sup> and *N. ceranae* specifically altered the expression of genes related to the ubiquitin-proteasome system and the oxidative phosphorylation. Both stressors affected the activity of enzymes in both the midgut and the brain, showing impact in organs that were not the sites of exposure. The data showed a systemic response of the honeybee and suggested a key role of protein turnover and respiration in the parasite-insecticide interaction.

### **G.2. Introduction**

The European honeybee (*Apis mellifera*) is exposed to a variety of stressors and the colony losses observed worldwide are thought to be multicausal (Potts *et al.*, 2010; Goulson *et al.*, 2015). Stressors include biotic and abiotic contaminants (i.e. pathogens and xenobiotics) as well as the environmental conditions (landscape, climate) and the honeybee genetic background; and all may interact, sometimes leading to a detrimental synergy on the honeybee survival or on other long-term sublethal effects (O'Neal *et al.*, 2018).

Among the most frequent pathogens, two parasites, Varroa destructor and Nosema ceranae, emerged few decades ago in Apis mellifera, most probably after a host jump from the Asian honeybee Apis ceranae and show now high prevalence in colonies worldwide (Klee et al., 2007; Genersch, 2010; Chaimanee et al., 2011). N. ceranae seems to have replaced the formerly spread Nosema apis in most of areas and is now the main intestinal parasite of the honeybee (Sinpoo et al., 2017), especially under warm climates, with prevalence reaching up to 97.1 % of the colonies (Rangel et al., 2018). N. ceranae belongs to Microsporidia, a group of obligate intracellular parasites related to fungi (Wadi and Reinke, 2020). The parasite infects honeybees by feco-oral route and develops within the midgut epithelial cells (Franzen, 2005). The infection alters, among other, the midgut epithelium integrity, the gut microbiota, the honeybee behaviour, the expression of genes involved in metabolism and immunity, leading to a variable reduction of honeybee lifespan (Goblirsch et al., 2018; Rouzé et al., 2019). At the colony level, the presence of N. ceranae is most often asymptomatic, although some link with colony losses have been observed (Villa et al., 2013). This variable impact of the parasite suggests a modulation in its virulence (Invernizzi et al., 2009). This variation could be linked to the parasite and host genetic backgrounds (Kurze et al., 2016), the quality of ressources (Di Pasquale et al., 2013; Zheng et al., 2014), but most effort has been focused on interactions with other contimants (Toplak et al., 2013; Retschnig et al., 2014; Tesovnik et al., 2020) as Microsporidia are thought to be opportunistic parasites that benefits from their host weakening (Vávra & Lukeš, 2013).

Concerning xenobiotics, the widespread use of pesticides has led to a ubiquitous presence of these agrochemicals in the environment, contaminating air, soil, waters and plants. An important diversity of pesticides has been found in foraged nectar and pollen and in hives products (Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Traynor et al. (2016) detected an average of 10.2 pesticide residues in wax samples from migratory colonies in the USA, with an estimated hazard particularly associated with insecticides and acaricides. Indeed, insecticides are of importance because of their high toxicity on the non-targeted honeybee. Honeybees may be directly exposed to insecticides during their foraging activities. Such exposition may be acute in case of concomitant spreading of insecticide formulation. Foragers may also bring back contaminants to the hive, leading to a chronic exposure of the whole colony population (Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Neurotoxic insecticides such as neonicotinoids and pyrethroids are among the most commonly detected and used insecticides (Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Neonicotinoids are agonists of the nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system, leading to postsynaptic overstimulation (Casida and Durkin, 2013). Pyrethroids rather impact the peripheral nervous system by modulating voltage-gated sodium channels, but also some voltage-gated channels channel, also leading to overstimulation. They can be quickly lethal upon acute exposure but can also induce sublethal effects following chronic exposure at very low doses, including alterations of behavior and memory, neuromuscular abilities, fecundity and metabolic activities (Decourtye et al., 2004; 2005; Belzunces et al., 2012; Fischer et al., 2014; Charreton et al. 2015; Christen et al., 2019; Zhang et al. 2020).

When foragers are exposed to insecticide outside the hive, they may be in contact with commercial formulations rather than active molecules alone. Most of toxicological studies have focuses on these molecules. Yet the formulations contain adjuvants that modulate the toxicity of the active ingredients (a.i.; Nagy *et al.*, 2020). In the present work, we thus focused on such formulations. Proteus<sup>®</sup> is a commercial formulation combining two insecticides: the systemic neonicotinoid thiacloprid and the non-systemic pyrethroid deltamethrin (in a ratio 10:1). Thus, it contains two complementary a.i. with distinct modes of action on both central and peripheral nervous systems, and is thought to deliver both flash and persistent actions. According to the manufacturer, Proteus<sup>®</sup> has a broad spectrum of activity (on thrips, aphids, psyllids, whiteflies, codling moth, tomato leafminer, *etc.*) and is spread on various cultures (as rapeseed, potato, beet or cereal crops). Calypso<sup>®</sup> and Decis<sup>®</sup> are formulations based on a single a.i., the thiacloprid and the deltamethrin respectively. They are also used on a wide spectrum of crops. Thiacloprid-based formulations have been banned from use in the European Union in 2020 (EU Commission SANTE/10450/2019).

The co-exposure of highly prevalent insecticides and pathogens is thus frequent in colonies and could have deleterious impact on the honeybee if they synergistically interacted. Such interactions between stressors have been studied. The most cited pathogen-pathogen interaction is likely the relationship between the Deformed Wing Virus (DWV) and V. destructor which ought to both carry the virus and enhance its replication (Annoscia et al., 2019). Concerning *N. ceranae*, the parasite is thought to facilitate the replication of the DWV and the Chronic Bee Paralysis Virus and to synergistically affect the honeybee survival with the Black Queen Cell Virus (Zheng et al., 2015; Toplak et al., 2013; Doublet et al., 2015). Experimental combined infection by N. ceranae together with N. apis altered the memory capacities of the honeybee (Charbonneau et al., 2016), and together with the trypanosomatid Crithidia mellificae modulated the gene expression for antimicrobial peptides (Schwarz & Evans, 2013). Combinations of pesticides have been more thoroughly studied. Fungicides and insecticides with low toxicity may increase the toxicity of neurotoxic insecticides, *i.e.* induce higher mortality (Thompson et al., 2014). Concerning a neonicotinoid-pyrethroid combination, the mixture of Belay<sup>®</sup> (a.i. clothianidin) and Karate<sup>®</sup> (a.i. λ-cyhalothrine) showed no synergistic effect on the honeybee mortality but on the weight of workers (Yao et al., 2018). Several studies focused on *N. ceranae* and neurotoxic insecticides interactions. A synergistic decrease in survival has been observed in response to the concomitant infection with the parasite and chronic exposure to neonicotinoids imidacloprid, thiacloprid and thiamethoxam (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011a; Retschnig et al., 2014; Doublet et al., 2015; Tesovnik et al., 2020), with sometimes modulations of gene expression of enzyme activity related to detoxification and immunity (Alaux et al., 2010; Naggar & Baer, 2019; Tesovnik et al., 2020). Neonicotinoids may also enhance the parasite success, but such higher parasite load is far to be systematically observed (Vidau et al., 2011a; Pettis et al., 2012, Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012). It is difficult to determine whether the insecticides sensitize the honeybee to *N. ceranae, e.g.* through immunosuppression, and/or whether the

parasite inversely weaken the honey towards insecticides. Both stressors affect common pathways but it is unclear if their combination initiates a specific response.

The aim of this study was to assess the impacts of two neurotoxic insecticide formulations, alone or combined, and their co-exposure with the gut parasite *N. ceranae*. In a first experiment honeybees were infected with *N. ceranae* spores and then exposed to environmental doses of Proteus<sup>®</sup> by spraying. The impact of treatments on survival and food uptake was monitored. Physiological response was assessed by transcriptomic analyses in the midgut (RNAseq or RT-QPCR) and enzymatic assays in midgut and the head. Changes in the hindgut microbial communities were also evaluated (16S sequencing or QPCR). In a second experiment Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup>, alone or in combination, were applied on infected and uninfected honeybees. The same analyses were performed but without RNAseq or 16S sequencing. Our goal was to identify potential mechanism explaining the stressors interactions.

## **G.3.** Materiels and Methods

#### G.3.1. Honeybees and infection with Nosema spores

Experiments were performed on emerging *A. mellifera* honeybees collected from the same apiary of the INRA Research Unit Abeilles & Environnement in Avignon (France) in May or June 2017. Frames were sampled from eight colonies free of treatments and previously checked to be free of *Nosema* spores. Frames were kept 24h at  $34\pm1^{\circ}$ C under humidified atmosphere. Newly emerged honeybees aged between 0 and 24h were mixed and distributed into cohorts of 70 individuals in Pain-type cages carrying a 5-mm piece of PseudoQueen (Inkto Supply, Vancouver, Canada). Honeybees were maintained in the dark at  $32\pm1^{\circ}$ C with  $70\pm3^{\circ}$ % of relative humidity and fed *ad libitum* with a 70 % (W/V) sucrose syrup supplemented with 1 % Provita'Bee (ATZ Dlététic, Mas Cabardès, France). Fresh pollen (Pollenergie, France) was provided *ad libitum* for the first 48 h. Feeders were replaced daily to quantify sucrose consumption. Dead bees were removed daily for survival analysis and to check the parasite proliferation. Survival analysis was performed using the Kaplan-Meier estimator. Synergy/antagonism was estimated according to Wraight (2003) using corrected mortality over control as in Wu *et al.* (2019)

The day they were encaged, half of the honeybees were individually infected with  $10^5$  spores of *N. ceranae* in 3 µL 50 % (w/v) sucrose syrup using a micropipette. Spores were prepared according to Vidau *et al.* (2011a) and checked to be free of *N. apis* by PCR (**Suppl. Table S1**). The presence or absence of *N. ceranae* in infected or non-infected honeybees respectively was checked by PCR using *N. ceranae* specific primer pair (**Suppl. Table S1**). At the end of the experiments, the spore amount in surviving infected honeybees was numerated by phasecontrast microscopy (x400) using KOVA Glasstic Slide 10 (Kova International Inc., Garden Grove, USA). For each experimental group, *ca.* 30 abdomens were individually homogenized in a final volume of 500 µL of distilled water then diluted to 1:100 before counting.

#### G.3.2. Intoxication with insecticides

Eleven days after caging, infected and non-infected honeybees were exposed by contact to insecticides formulations purchased from Bayer CropScience. Anesthetized honeybees were deposited a 200 cm<sup>2</sup> Plexiglas disc rotating at 23 rpm and insecticides were sprayed using a calibrated Potter-type tower (Colin and Belzunces, 1992). The formulations were diluted in water shortly before spraying. Two experiments were performed. In the first one (May) three concentrations of Proteus<sup>®</sup> (active ingredient thiacloprid 100 g.L<sup>-1</sup> and deltamethrin 10 g.L<sup>-1</sup> were tested resulting in eight experimental groups: untreated control (Ct), exposure to 0.05 L.ha<sup>-1</sup> Proteus<sup>®</sup> equivalent to 0.5 g/ha and 5 g/ha of deltamethrin and thiacloprid respectively (P<sub>0.5:5</sub>), exposure to 0.1 L.ha<sup>-1</sup> Proteus<sup>®</sup> (P<sub>1:10</sub>) and to 0.2 L.ha<sup>-1</sup> Proteus<sup>®</sup> (P<sub>2:20</sub>), infection with N. ceranae spores (N), and infection followed by intoxication with the same quantities of insecticide (NP<sub>0.5:5</sub>, NP<sub>1:10</sub>, NP<sub>2:20</sub>). For the second experiment (June), honeybees were exposed to Decis Protech<sup>®</sup> (a.i. deltamethrin 15 g.L<sup>-1</sup>) and/or Calypso<sup>®</sup> (a.i. thiacloprid 480 g.L<sup>-1</sup>) at similar concentrations of active ingredients as in the highest Proteus® treatment, resulting eight other experimental groups: control (Ct), exposure to 0.13 L.ha<sup>-1</sup> Decis® equivalent to 2 g.ha<sup>-1</sup> of deltamethrin (D<sub>2:0</sub>), exposure to 0,04 L.ha<sup>-1</sup> Calypso<sup>®</sup> equivalent to 20 g.ha<sup>-1</sup> of thiacloprid ( $C_{0:20}$ ), exposure to the combination of both insecticides (DC<sub>2:20</sub>), infection with *N. ceranae* spores (N), and both infection and the three intoxication treatments (ND<sub>2:0</sub>, NC<sub>0:20</sub>, NDC<sub>2:20</sub>). Seven to nine replications were performed for each experimental group. Using an apparent surface area of 1.05 cm<sup>2</sup>.bee<sup>-1</sup> (Poquet *et al.,* 2014), bee received ca. 21 and 210 ng.bee<sup>-1</sup> of deltamethrin and thiacloprid respectively for the  $P_{2:20}$  and  $DC_{2:20}$ treatments, corresponding to 42% and 0.8% of the LD<sub>50</sub> of the insecticides (Mullin *et al.*, 2010).

#### G.3.3. RNA extraction from midgut

Midguts from 6 honeybees were dissected on ice, pooled, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for 24 h maximum. The midguts were homogenized in 500  $\mu$ L RLT buffer (Qiagen) with 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol and mechanically homogenized in the presence of 100 mg of 0.5 mm silica beads (previously washed with diethyl pyrocarbonate) using a TissueLyser II (Qiagen) for 6 cycles of 30 s at 30 Hz with 20 s interruptions on ice. After 3 series of thermal shocks at 65°C and in liquid nitrogen, ground samples were centrifuged 1 min at 10 000 x g and supernatant was collected and mixed with 1 volume of 70% ethanol. Total RNA was purified using RNeasy spin column (RNeasy Mini Kit, Qiagen) according to the kit instructions. Genomics DNA was removed using the RNA-free DNase set (Qiagen) twice. RNA quality and concentration were checked using the RNA ScreenTape kit on the 2200 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

#### G.3.4. Gene expression analysis by RNA sequencing

Analyses were performed on four experimental groups of the first experiment (Ct, N,  $P_{2:20}$ ,  $NP_{2:20}$ ). For each condition, the four RNA replicates with the best quality were selected. 2 to

3  $\mu$ g of RNA were provided for RNA-seq analysis for additional quality controls, library preparation and sequencing using the Illumina NextSeq500 system (Helixio, Saint-Beauzire, France). Image analysis was controlled with the Sequencing Analysis Viewer 1.8.37. One  $NP_{2:20}$ replicate was discarded from the analysis because of a high amount of viral sequences. Between 16 and 25 million reads per sample were mapped using Bowtie on A. mellifera Amel HAv3.1 transcriptome. Functional annotations were completed using KEGG pathways (Kanehisa et al., 2019). Cytochrome P450 genes were annotated according to Neslon (2009). For infected samples between 2 and 5 Mo reads per sample were mapped on N. ceranae GCA\_000988165 transcriptome. Reads counts were normalized and compared on the Galaxy platform (Afgan et al., 2018), using the Cuffdiff software from the Cufflinks suite, with default settings but rescuing multireads (Trapnell et al., 2010). Among the 28,328 entries 26,158 were detected at least once, *i.e.* at least one on the 15 samples showed a positive Fragments Per Kilobase per Million reads (FPKM) value. Only 10,975 transcripts were considered as expressed enough in the midgut for further analyses, using a threshold of FPKM>3 for at least one mean values among the 4 tested conditions. Al last 1,098 transcripts were differentially expressed, *i.e.* with at least one corrected q-value below 0,05 among the 5 following pairwise comparisons: P2:20 vs Ct, N vs Ct, NP2:20 vs N, NP2:20 vs P2:20, NP2:20 vs Ct). Statistical variance and clustering analyses were performed using Past software (Hammer et al., 2001).

#### G.3.5. Gene expression analysis by RT-QPCR

cDNA synthesis was performed using the GoScript Reverse Transcriptase Kit (Promega) in a 20  $\mu$ L reaction containing 0.5  $\mu$ g of total RNA, 0.5  $\mu$ g of oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers, 0.5 mM of each dNTP, 5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 20 u of Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor and 1  $\mu$ L of GoScript Reverse Transcriptase. Quantitative PCR (qPCR) were performed as described in Aufauvre *et al.* (2014) using 5  $\mu$ L of 1:30 diluted cDNA, 0.5  $\mu$ M of each primer and 10  $\mu$ L of 2X Absolute BlueQPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) in 20  $\mu$ L. Primers used in this work are listed in **Suppl. Table S1**. The amplification specificity, linearity, efficiency and reproducibility were validated for all primer pairs. Amplifications were performed in 96-well white plates (Eurogentec) on a CFX96 Real-Time System thermocycler (Biorad) monitored by CFX manager 3.1 software with the same program as Rouzé *et al.* (2019). Cycle of quantification (Cq) values were normalized by subtracting the Cq value of the reference gene RPS5 from the corresponding cDNA sample. Gene expressions of each treatment were then compared to their respective control and significant differences were evaluated using the non-parametric Mann & Whitney test (p-values < 0.05).

#### G.3.6. Enzyme activities

For each replicate, protein extraction was performed on a pool of 4 honeybee heads or 4 midguts dissected 16 days after infection. Tissues were weighed and extracts were obtained by adding 10% (w/v) of a phosphate-based lysis buffer supplemented with protease inhibitors

as described by Carvalho *et al.* (2013) and a mechanical treatment using a 6-mm steel bead and a TissueLyser II (Qiagen). Total protein concentrations using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) with 1:5 dilutions of head extracts or 1:10 dilutions of midgut extracts.

Acetylcholine esterase (AChE), glutathione-S-Transferase (GST), and CAT activities were measured according to Carvalho *et al.* (2013) following fluorescence for 9 min, 9 min and 1 min respectively. Glutathione peroxidase (GP) and alkaline phosphatase (AP) activities were measured for 9 min according to Kairo *et al.* (2017). Enzyme assays were performed in triplicate in 96-well plates and a final reaction volume of 200 µL using an Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek). Enzyme activities were expressed both as specific and tissue activities, respectively normalized to the total concentration of proteins or weight of tissue.

#### G.3.7. DNA extraction

Six honeybee hindguts were dissected on ice, pooled and flash frozen in liquid nitrogen 16 days after infection. Hindguts homogenized in 800  $\mu$ L of RLT buffer (Qiagen) supplemented with 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol as described by Rouzé *et al.* (2019) using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Total DNA concentrations and purity were checked using a Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific).

#### G.3.8. Bacterial 16S sequencing

Analyses were performed on the same four experimental groups as for RNA-seq (Ct, N,  $P_{2:20}$ , NP<sub>2:20</sub>). For each condition, five DNA replicates were selected. DNA samples were amplified using Platinium Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and the 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 806R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') primer pairs targeting the V3-V4 region. Primers were tagged with one 7-nt barcode per condition. Reactions were performed in a final volume of 30  $\mu$ L using 0.3  $\mu$ M of each primer, 2 mM of MgSO<sub>4</sub> and 0.2 mM of each dNTP. The PCR program consisted in 2 min at 94°C then 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s of annealing at 55°C and 30 s of elongation at 68°C. The amplification was checked by gel electrophoresis and samples were purified with Nucleospin Gel and PCR Cleanup Kit (Macherey-Nagel). DNA content and purity were checked using a Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific). One library per biological replicate was prepared by mixing 170 ng of amplification products of each experimental group. Libraries were treated for 2 × 300 nt paired-end sequencing on an Illumina MiSeq system (GENEWIZ, Bishop's Stortford, UK). The quality of the raw-data was evaluated with FastQC. Demultiplexing and cleaning were performed with FROGS pipeline (Escudié et al., 2018) resulting in 84,984 to 296,895 reads per sample. Data sets were normalized by randomly picking 84,000 reads for each sample and replicate. The clustering was performed with FROGS using the SILVA 132 rRNA database (Quast et al., 2013), resulting in 173 Operational Taxonomic Units (OTUs). In order to avoid biases due to the inoculation of exogenous bacteria together with Nosema spores, only OTUs

Table 1. Concentrations of active ingredients in formu	ulations, at recommended doses
and in the treatments applied in this work.	

Formulations		Proteus®	)	Decis	® C	Calypso®
Thiacloprid (g.L <sup>-1</sup> )		100		-		480
Deltamethrin (g.L <sup>-1</sup> )		10		15		-
Min-max recommended dose (L.ha <sup>-1</sup> )		0.45-0.75	5	0.33-0.3	83 0.	15-0.375
Thiacloprid (g.ha <sup>-1</sup> )		45-75		-		72-180
Deltamethrin (g.ha <sup>-1</sup> )		4.5-7.5		4.95-12	.45	-
Sprayed doses	P <sub>2:20</sub>	P <sub>1:10</sub>	P <sub>0.5:20</sub>	D <sub>2:0</sub>	C <sub>0:20</sub>	DC <sub>2:20</sub>
Thiacloprid (g.ha <sup>-1</sup> )	20	10	5	-	20	20
Deltamethrin (g.ha <sup>-1</sup> )	2.0	1.0	0.5	2.0	-	2.0
Thiacloprid per bee (ng.bee <sup>-1</sup> )*	210	105	53	-	210	210
Deltamethrin per bee (ng.bee <sup>-1</sup> )*	21.0	10.5	5.3	21.0	-	21.0

\*Calculated according to Poquet *et al.* (2014)

Suppl. Table S1. Primer pairs used in this study for quantitative PCR on transcripts.

Gene ID	Gene product	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Reference
LOC410562	Ser/Thr-protein kinase meng-po	KmpX1-F2 GCCTTAGAAGCGAACGTCAG	KmpX1-R2 TCCTTTCGAACGTTGGCTTG	This work
LOC410175	F-box/LRR-repeat protein 14	FLRRp14-F2 ATCTTGGTCTTTGGCACGTG	FLRRp14-R2 TACGAATGTAGGGAGGACGC	This work
LOC724308	Serine protease 53	SP53-F1 CAAGTTGCCTCGGATCCAAG	SP53-R1 GAAGCGCCGCATATATGTCC	This work
LOC411182	Ubiquitin-protein ligase E3A	ubE3AX1-F1 CCACCGGAAAGTCAACGAAG	ubE3AX1-R1 ACATTGTAGCATGTGTGGGC	This work
LOC411694	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1	ubKCMF1X1-F1 GCTTTGTCAAACATTGCCGG	ubKCMF1X1-R1 AGCATTTGGTGTTTCGGGAC	This work
LOC112939925	cytochrome P450 6a13-like	Cyp6a13-F1 GCGACCAATGCGAATGAAAC	Cyp6a13-R1 CAGCTAACTCACGGCATTCC	This work
LOC725936	titin homolog	titinh-2-F2 AGTTGGAACGGTTCGAGGAT	titinh-2-R2 CCACTTCATGCTGCCGATTAA	This work
LOC413705	acidic mammalian chitinase-like	chi413705-F2 GACAAGCTGGACCTTATACACG	chi413705-R2 GTTGTTCAGGCTCACGTACC	This work
LOC412815	fatty acid synthase	FAS-F TCTCTTGGTTAGCCAGGGTG	FAS-R ACTTCCCCATTGTCCTCCTT	Derecka <i>et</i> <i>al.,</i> 2013
LOC726269	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	Gtpx2-F GGAAGTGGTTGAAGACACAAGC	Gtpx2-R ACAGTTGGTGCAAATCGAGA	Aufauvre <i>et al,</i> 2014

present in non-infected honeybees were selected. Those represented at least 98.2 % of the reads of uninfected samples. At last, taxa representing less than 0.05% of the whole reads were discarded. The remaining OTUs with the same taxonomic attribution were eventually gathered, resulting in 11 taxonomic groups.

#### G.3.9. Quantification of bacterial taxa abundance by qPCR

The qPCR quantification was performed as previously described by Rouzé *et al.* (2019) for four bacterial taxa, namely *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *G. apicola* and *S. alvi*. Reactions were performed in a final volume of 20  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of 2X Mesa BLUE MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec), 0,5  $\mu$ M of each primer (**Suppl. Table S1**) and 7 to 24 ng of total genomic DNA. The PCR program consisted of a 10 min initial step at 94°C, 40 cycles comprising 94°C for 15 S, 20 s of annealing at 53°C and 40 s of elongation at 72 °C. Treated and untreated samples were quantified on the same microplate in duplicate. Data were normalized to the total bacterial DNA content using the two reference primer pairs to avoid biases due to non-bacterial DNA (Rouzé *et al.*, 2019).

### **G.4. Results and Discussion**

## **G.4.1.** Insecticides and parasite affect the honeybee survival at short and long term respectively

Honeybees were non-infected or infected with spores of *N. ceranae* (N). After 11 days they were exposed by spraying to none or to three concentrations of the insecticide formulation Proteus<sup>®</sup> equivalent to 0.5 g.ha<sup>-1</sup> of deltamethrin plus 5 g.ha<sup>-1</sup> of thiacloprid (P<sub>0.5:5</sub>), twice (P<sub>1:10</sub>) and four times (P<sub>2:20</sub>) this concentration (**Table 1**). A second experimental set was composed of honeybees similarly infected and then exposed to a Decis<sup>®</sup> treatment equivalent to 2 g.ha<sup>-1</sup> of deltamethrin (D<sub>2:0</sub>), to Calypso<sup>®</sup> equivalent to 20 g.ha<sup>-1</sup> of thiacloprid (C<sub>0:20</sub>), and to both insecticides (DC<sub>2:20</sub>). The applied concentrations were below the lowest advised application on culture (4.5 g.ha<sup>-1</sup> of deltamethrin and 45 g.ha<sup>-1</sup> of thiacloprid on potato cultures with Proteus<sup>®</sup>).

The analysis of mortality 24 h post-intoxication (12 days post-infection) did not show any impact of the low Proteus<sup>®</sup> treatments (P<sub>0.5:5</sub> and P<sub>1:10</sub>) but a significant impact of the highest dose (P<sub>2:20</sub>, **Fig.1A**). Infected honeybees were more susceptible to the Proteus with significant survival reduction for NP<sub>1:10</sub> and NP<sub>2:20</sub> whereas *N. ceranae* alone did not increase mortality. The combination of the pathogen and Proteus<sup>®</sup> showed a synergistic impact on honeybee mortality ( $\chi^2$ =21, 20 and 43 with increasing concentrations, *df*=1,  $\alpha$ =0.01). For the second experiment, whereas individual treatment (D<sub>2:0</sub>, C<sub>0:20</sub>) had not effect, the combination of Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup> (DC<sub>2:20</sub>, **Fig. 1B**) synergistically ( $\chi^2$ =64, *df*=1,  $\alpha$ =0.01) increased the mortality of honeybees compared to control. The impact of DC<sub>2:20</sub> was similar to that of P<sub>2:20</sub>. *N. ceranae* did not change the impact of Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup> 24 h post-intoxication. The long-



**Figure 1.** Proportion of honeybee mortality in response to *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup> (A,C,E) or to *N. ceranae*, Décis<sup>®</sup> and/or Calypso<sup>®</sup> (B,D,F). Honeybees were orally exposed to *N. ceranae* (N) at day 0 and exposed by spraying at day 11 to three Proteus<sup>®</sup> concentrations (P<sub>0.5:5</sub>, P<sub>1:10</sub>, P<sub>2:20</sub>) or to Decis<sup>®</sup> (D<sub>2:0</sub>), Calypso<sup>®</sup> (C<sub>0:20</sub>), and to both insecticides (DC<sub>2:20</sub>). A,B. Mean proportion of mortality 24h after spraying of the insecticide formulations (day 11). C,D. Mean proportion of daily mortality following intoxication (days 13 to 23) calculated from of the Kaplan-Meier estimator. E,F. Mean proportion of honeybee mortality at the end of the experiment (day 23). Identical letter above bars indicate the absence of significant difference (Mann-Whitney, p>0,05, n=7 to 9). A star indicates a synergistic effect of the combined corresponding stressors.

term analysis of honeybee survival from day 12 to the end of the experiment (day 23) showed a significant decrease of survival of infected honeybees, except for the NP<sub>2:20</sub> and NDC<sub>2:20</sub> treatments most probably due to high mortality induced 24h post-treatment (**Fig. 1C, D**, **Suppl. Fig. S1**). At the end point of the experiment the mortality was significantly higher for P<sub>2:20</sub> and infected honeybees, whatever they were intoxicated or not (**Suppl. Fig. S1**). No synergistic interaction was observed.

Parasite and insecticides alone induced significant honeybee mortality but with different temporal dynamics (**Fig. 1**). The insecticides significantly reduced the short-term survival of honeybee, with a drop observed after one day but not afterwards. In contrast, *N. ceranae* affected the long-term survival, with a constant reduced survival rate during the second half of the experiment, *i.e.* all along the parasite development. Such impact of the parasite on the honeybee mortality in laboratory experiments has been previously observed with variable severity (Vidau *et al.*, 2011a; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013; Aufauvre *et al.*, 2014; Paris *et al.*, 2017; Rouzé *et al.*, 2019). Detrimental effect of *N. ceranae* was also observed in field experiments (Higes *et al.*, 2009; Botias *et al.*, 2013).

Since N. ceranae seemed to affect more the survival in the first experiment, we tested whether the parasite success differed at the end of the experiments. No spore was detected in uninfected samples (n=30 per condition). The spore numeration highlighted a significantly more important parasite content in the hindgut of honeybees at the end of the first experiment (Fig. 2). The parasite proliferated to an average of 101 ± 5 and 19.2 ± 1.5 millions of spores per honeybee for the first (Proteus®) and the second (Decis®, Calypso®) experiments respectively, despite the use of the same spore preparation, the same colonies and the same materials and methods. The only difference was the one-month lag of sampling time of workers. The reduced mortality and parasite success could be due to a better honeybee tolerance towards the parasite through the natural history of colonies that experienced beneficial changes in their environmental conditions (weather, resources, presence of different stressors) or in the workers' genetic background (dynamics of patrilines) (Potts et al., 2010). Indeed, colonies from the same beehives vary in their sensitivity to N. ceranae (Fontbonne et al., 2013). Interestingly, a significant decrease in sugar consumption was observed in infected honeybees in the first experiment but nor the second one where only the combined treatment NDC<sub>2:20</sub> showed such a decreased consumption compared to control (Fig.3), suggesting a reduced effect on the food uptake when the infection success is low.

Concerning insecticides, the short-term mortality following acute contact exposure contrasted with the long lasting overmortality observed following chronic oral exposure to low doses of active ingredients (Retschnig *et al.,* 2014; Aljedani & Almehmadi, 2016). The data also suggested that the surviving honeybees are able to recover from a contact exposure to insecticides. This could be due to the detoxification capacities of the honeybee that could



Fig. 2. Parasite success of *N. ceranae* by counting the spores present in the abdomen at the end of the experiment (23 d after infection) with or without contact exposure to (A) Proteus<sup>®</sup> (P<sub>0.5:5</sub>, P<sub>1:10</sub>, P<sub>2:20</sub>) and (B) Décis<sup>®</sup> (D<sub>2:0</sub>), Calypso<sup>®</sup> (C<sub>0:20</sub>) or both (DC<sub>2:20</sub>). There was no significant difference between treatments (Mann-Whitney, p>0,05, n=21 to 39). There was a very significant difference (p=10<sup>-32</sup>) between experiments; note the change of scale between experiments 1 (A) and 2 (B). No spore was detected in uninfected samples.



**Fig. 3. Daily sucrose consumption of honeybees (A)** after infection by *N. ceranae* (N) and contact exposure **A)** to three Proteus<sup>®</sup> concentrations ( $P_{0.5:5}$ ,  $P_{1:10}$ ,  $P_{2:20}$ ) or **B)** to Decis<sup>®</sup> ( $D_{2:0}$ ), Calypso<sup>®</sup> ( $C_{0:20}$ ), and to both insecticides ( $DC_{2:20}$ ). Sucrose consumption was measured daily by weighting feeding tubes and calculating the surviving honeybees. It showed a constant food uptake all along the experiments. The daily mean sucrose consumption was based here on the slope of cumulative sucrose consumption following intoxication (day 12 to day 23). Identical letter above bars indicate the absence of significant difference (Mann-Whitney, p>0,05, n=7 to 9).

metabolize the insecticides through the regulation of cytochrome P450 (CYP) genes. Such metabolization has been demonstrated following oral exposure to imidacloprid, with differences in the produced metabolites, whose toxicity may vary, between organs (Suchail *et al.*, 2004a, 2004b). As a consequence, honeybees may have partly recovered from paralysis (Schott *et al.*, 2017).

The observed synergistic interactions between Decis® and Calypso® in acute toxicity (24h after contact exposure, Fig. 1B) illustrated the combined actions of the neurotoxic deltamethrin and thiacloprid present in Proteus®. The supplier however does not mention a synergistic action of active ingredients but complementary ingredients allowing both immediate and persistent activity. To our knowledge, this is the first data showing a synergistic effect of those insecticides on an insect species. Their combination was studied, e.g. on the whitefly Neomaskellia andropogonis (Behnam-Oskuyee et al., 2018), but without comparison with the single treatments that proved their synergy. On non-target species, no synergy between the deltamethrin and thiacloprid was observed on the development and mortality of the aquatic dipteran Chironomus riparius (Kunce et al., 2015) while a synergistic increased of the cytotoxicity and genotoxicity in bone marrow cells was observed in rats orally exposed to a combination of Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup> (Sekeroğlu et al., 2011). However, synergies between other pesticides have been observed (Iwasa et al., 2004; Glavan and Božič, 2013). One study focused on pyrethroid and neonicotinoid insecticides in a closely related species. Gill et al. (2012) exposed bumblebee (Bombus terrestris) colonies to the neonicotinoid imidacloprid (*per os*) and to the pyrethroid  $\lambda$ -cyhalothrin (spray). The combined treatment significantly and synergistically ( $\chi^2$ =33, df=1,  $\alpha$ =0.01) increased honeybee worker losses compared to single treatment alone. Other studies also observed synergistic effects on terrestrial insects with mixture of such insecticide families (Levchenko and Silivanova, 2019; Gaire et al., 2020). Thus, synergy may not be only observed on individuals in laboratory conditions, but also at the colony level despite its "buffering effect" that would reduce the impact of stressors (Straub et al., 2015; Sponsler and Johnson, 2017).

The honeybee mortality 24h after insecticide exposure was also synergistically increased by Proteus<sup>®</sup> and *N. ceranae* (**Fig. 1A**). This was obvious for the highest Proteus<sup>®</sup> concentration but such a synergy was not observed with the corresponding Decis<sup>®</sup>+Calypso<sup>®</sup> mixture despite the similar mortality in response to DC<sub>2:20</sub> and P<sub>2:20</sub> alone. As mentioned before, this may be due to the reduced impact and parasite success in the second experiment. Moreover, the composition of formulation may differ in their adjuvants that may be toxic themselves or influence the interactions (Mulin, 2015; Nagy *et al.*, 2020). Interactions between *Nosema* infection and orally administrated insecticides, including thiacloprid, have been previously studied although a synergy was not always observed (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012; 2014; Doublet *et al.*, 2014). Most of the time, pesticides are thought to increase the honeybee susceptibility towards pathogens (O'Neal *et al.*, 2018). However, the

effect of insecticide on parasite success is unclear. Chronic and oral sublethal exposure to insecticides could increase the spore load (Vidau *et al.*, 2011a; Pettis *et al.*, 2012) but not always (Aufauvre *et al.*, 2014; Collison *et al.*, 2015; Paris *et al.*, 2017). Here, the amount of spores produced at the end of the experiment did not significantly differ with or without insecticides, *i.e.* the insecticide treatments did not enhance the parasite success (**Fig. 2**). Honeybees were exposed to insecticides 11 days after spores ingestion, *i.e.* there was enough time to achieve fully developed infection (Forsgren and Fries, 2010). The co-exposition of parasite and Proteus<sup>®</sup> significantly increased the short-term lethal effect of acute intoxication but not the long-term mortality, leading to the hypothesis that the parasite may also sensitize the honeybees to insecticides.

In conclusion, single contact exposure to insecticide and *N. ceranae* infection affect the honeybee survival with different patterns and can synergistically interact, as well as Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup>. Insecticides did not alter the parasite success. However, interactions between stressors may vary with the natural history of colonies. The observed overmortality in NP<sub>2:20</sub> could not be explained by a better parasite success but physiological data may give hints about the mode of action of stressors and their interactions.

# G.4.2. Proteus<sup>®</sup> and *N. ceranae* altered the midgut transcriptome more intensely when combined

RNAseq analyses were performed on four experimental groups of the Proteus<sup>®</sup> experiment: control (Ct), infected (N), exposure the highest Proteus<sup>®</sup> treatment (P<sub>2:20</sub>) and both infected and intoxicated (NP<sub>2:20</sub>). Pairwise comparisons resulted in 1,098 differentially expressed transcripts between two conditions (Suppl. Table S2, available on demand). Principal Component Analyses (PCAs) strongly differed using the 10,975 expressed transcripts, whatever they were regulated or not, or the 1,098 differentially expressed transcripts only. The first set of data showed a strong effect of *N. ceranae* but not Proteus<sup>®</sup>. The combined NP<sub>2:20</sub> treatment led to a very different response than *N. ceranae* alone, suggesting that the pesticide modified the honeybee response to the parasite (Suppl. Fig. S2A, B). However, this effect disappeared when only the significantly regulated transcripts were considered. The infected samples N and NP<sub>2:20</sub> were grouped together, showing a strong impact of the parasite, a weaker impact of the pesticide and no combined effect (Suppl. Fig. S2C, D). Hierarchical analyses using the 1,098 differentially expressed transcripts also separated the infected samples from the non-infected ones, but did not further group samples according to treatments (Suppl. Fig. S3). Non-parametric multivariate analyses confirmed the significant effect of the parasite, the absence of significant effect or Proteus® and the absence of significant interaction between both stressors on the differentially expressed transcripts (Suppl. Table S3).

There were 487 transcripts differentially expressed in response to the parasite, whatever the Proteus<sup>®</sup> treatment (*i.e.* comparing N vs Ct and NP<sub>2:20</sub> vs P<sub>2:20</sub>), among which 113 (23%)

responded both in the presence and absence of insecticides (**Suppl. Fig. S4A**). Only four of those were divergent, *i.e.* they responded in opposite way in the presence or absence of insecticides. The good concordance of genes responding to *N. ceranae*, in the presence or absence of Proteus<sup>®</sup>, allowed compiling more genes modulated by the parasite, pooling modulated transcripts from the N *vs* Ct and the NP<sub>2:20</sub> *vs* P<sub>2:20</sub> comparisons. 453 transcripts were differentially expressed in response to Proteus<sup>®</sup>, whatever the infection status. Only 58 (13%) responded in both the presence or absence of the parasite (**Suppl. Fig. S4B**). Among those only 9 (16%) transcripts were divergent. The good concordance of genes allowed the same compilation of regulated transcripts by Proteus<sup>®</sup> as before.

They were thus only 10 divergently regulated transcripts in the whole dataset, that included gene encoding the cuticular apidermin 2 (Apd-2), one cytochrome P450 (Cyp4g11), the antimicrobial defensin-1 (Def1) and the serine protease 53 (LOC724308). The very few number of divergent transcripts suggested that one stressor did not seem to reverse the honeybee response to the other one, although it induced the differential expression of other sets of genes.

In order to assess a possible global response of the midgut to stressors, activated and repressed genes by *N. ceranae* and Proteus<sup>®</sup> were compared. 784 transcripts were regulated by *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup>, excluding the 10 divergently regulated genes (**Suppl. Fig. S5A**). 136 of them responded to both stressors, and 70% of those were regulated in the same way.

There were 732 differentially expressed transcripts (including the divergent ones) comparing the combined parasite-pesticide treatment to the untreated control (NP<sub>2:20</sub> vs Ct, **Suppl. Fig. S5B**). Noteworthy 78% of them were repressed and 58% (26 activated and 278 repressed) were specific to the NP<sub>2:20</sub> vs Ct comparison. Except ubiquitination and oxidative phosphorylation pathways, no other functional appeared specifically regulated in NP<sub>2:20</sub> vs Ct. The combined treatment induced a stronger but not very specific response from the honeybee. More than 66% of the transcripts regulated by any of the stressors were downregulated. The parasite seemed particularly to induce a global reduction on the mean expression level that was stronger in the combined parasite-insecticide treatment (**Suppl. Fig. S6**).

RNAseq reads obtained in infected conditions were also mapped against *N. ceranae* genome. No parasite gene appeared significantly differentially expressed in the presence of Proteus<sup>®</sup> (NP<sub>2:20</sub> vs N condition) in the midgut. The insecticide treatment did not significantly affect the parasite transcriptome.

**Table 2. Differentially expressed transcripts in response to** *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup>. Relative expression is given as a ratio compared to control or to single treatment (upper line). ×: upregulation, ÷: downregulation. Significant difference is indicated by color (×: upregulation in red, ÷: downregulation in green). A gene may appear twice if there were distinct transcripts isoforms.

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function
Detoxication (and	notation c	of CYPs fro	m A. mell	<i>ifera</i> geno	ome / from	n Nelson, 2019)
LOC112939925	÷1.50	×1.55	÷1.41	×1.65	×1.10	CYP6a13-like / CYP6AS1
LOC726690	÷1.10	×1.71	÷1.20	×1.57	×1.43	CYP6a14 / CYP6AS2
LOC412209	×1.16	×1.45	÷1.16	×1.08	×1.25	CYP6a17 / CYP6AS4
Cyp6as5	×1.11	×1.46	×1.28	×1.67	×1.86	CYP6AS5
LOC107965400	÷1.28	×1.79	÷1.08	×2.12	×1.66	CYP6a14 / CYP6AS9
LOC725159	÷1.52	÷1.21	÷1.26	×1.00	÷1.52	CYP6a14 / CYP6AS10
LOC724946	÷2.51	÷3.03	÷1.11	÷1.35	÷3.38	CYP6a14-like / CYP6AS14
LOC551197	÷1.29	÷1.56	÷1.37	÷1.65	÷2.14	CYP6a13 / CYP6AS15
LOC725087	×1.20	×1.83	×1.29	×1.98	×2.37	CYP6a14 / CYP6AS16
CYP6AQ1 (1)	÷2.70	÷3.65	×1.18	÷1.15	÷3.10	CYP6AQ1
CYP6AQ1 (2)	÷2.49	÷2.70	×1.44	×1.33	÷1.88	CYP6AQ1
LOC551560	÷1.26	÷1.70	÷1.69	÷2.27	÷2.87	CYP6k1 / CYP6BD1
LOC410492	÷1.11	÷1.92	×1.10	÷1.58	÷1.75	CYP9e2 / CYP9Q1
LOC408453	÷1.51	÷1.57	×1.27	×1.22	÷1.24	CYP9e2/CYP9Q3
LOC100577883	×1.80	÷1.97	÷1.53	÷5.42	÷3.00	CYP4aa1-like/CYP4AA1
LOC413833	÷1.03	÷1.11	÷1.68	÷1.82	÷1.87	CYP4C1 / CYP4AB3
Cyp4g11	÷2.09	÷8.88	×64.2	×15.1	×7.23	CYP4G11
LOC726134	÷1.39	÷1.58	÷1.09	÷1.23	÷1.72	carboxylesterase
LOC725942	×1.11	÷1.09	÷1.35	÷1.64	÷1.47	glutathione S-transferase 1-1
LOC408369	×1.46	×3.25	÷1.35	×1.65	×2.41	glutathione-specific γ-glutamylcyclotransferase 2
LOC411021	÷1.14	×1.44	÷1.24	×1.32	×1.16	UDP-glucuronosyltransferase 2B18
LOC413043	÷1.40	÷2.28	×1.14	÷1.43	÷2.01	UDP-glucuronosyltransferase 1-3
LOC413959	÷1.13	÷1.09	÷1.46	÷1.42	÷1.60	multidrug resistance-associated protein 4
LOC725993	÷1.23	×1.30	÷1.54	×1.04	÷1.19	multidrug resistance-associated protein 7
Oxidation balanc	e					
LOC408953	×1.11	÷2.00	×1.33	÷1.66	÷1.50	peroxidase
LOC551544	÷2.07	÷2.12	×1.24	×1.21	÷1.71	peroxidase
LOC726269	÷1.10	÷1.25	÷1.57	÷1.78	÷1.96	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
Sod2	÷1.18	÷1.27	÷1.31	÷1.42	÷1.67	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Трх-3	÷1.25	÷1.16	÷1.26	÷1.18	÷1.47	thioredoxin peroxidase 3 isoform 1
Tpx-4	÷1.34	÷1.35	÷1.41	÷1.42	÷1.90	peroxiredoxin-like protein
LOC409451	×1.05	×1.82	÷1.42	×1.21	×1.28	thioredoxin-2

#### G.4.3. N. ceranae and Proteus® regulated genes involved in general functions

#### G.4.3.1. N. ceranae and Proteus® regulated the expression of detoxification genes

Many genes involved in the main steps of xenobiotics detoxification (Berenbaum & Johnson, 2015) were regulated, including modification enzymes, such as cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) and carboxylesterase, (de)conjugation enzymes, e.g. glutathione-*S*-transferases (GSTs) and UDP-glucuronosyltransferases, and multidrug resistance-associated proteins (**Table 2**).

The expression of CYP genes were particularly regulated by both Proteus<sup>®</sup> and/or *N. ceranae*. Five and nine genes of them were upregulated and downregulated by the parasite respectively, seven were downregulated by Proteus<sup>®</sup>. Most were regulated by single treatment vs control (N vs Ct or P2:20 vs Ct) and not using combined comparisons (NP2:20 vs P<sub>2:20</sub> or NP<sub>2:20</sub> vs N). CYP4G11 was one of the few divergent gene: it was repressed by the stressors alone but activated in combined treatment. Overexpression of CYP genes is common in response to insecticides and in insecticide resistant insect strains (Gong and Diao, 2017). There are four clades of insects CYPs: CYP2 (8 genes in A. mellifera genome), CYP3 (28 genes), CYP4 (4 genes) and mitochondrial CYP (6 genes, Feyereisen, 2006). All regulated CYP genes were from clades CYP3 (families CYP6 and CYP9) and CYP4 that are the most important clades in xenobiotics metabolism. CYP3 genes differ in their expression level in different organs, and their products in their capacities to metabolize different neonicotinoids (Manjon et al., 2018). For instance, CYP9Q3 is highly efficient but CYP6AS5, which was upregulated in NP<sub>2:20</sub>, participates in thiacloprid degradation. An oral exposure to imidacloprid induced the downregulation of CYP9Q3, as observed here, and the upregulation of CYP4G11 in the whole honeybee (Dee Smet et al., 2017). Most regulated CYP genes were downregulated by Proteus<sup>®</sup> while *N. ceranae* had opposite effect on different genes. The differential regulation of genetically polymorphic CYP genes observed here may thus result from their specificity towards the stressors. Several studies suggested that an inhibition of CYP by fungicides or acaricides would lead to an increased sensitivity to insecticides, including thiacloprid and deltamethrin, and thus to a synergy between pesticides (Gong and Diao, 2017). As CYP genes responded differently to stressors, the resulting CYPs levels could be less efficient for insecticide degradation, e.g. the differential regulation of CYP genes by N. ceranae could alter the CYPs balance against insecticides contained in Proteus<sup>®</sup>, thus leading to synergistic effects.

Among the genes involved in antioxidant activities, only one was upregulated, LOC409451 (encoding the mitochondrial thioredoxin-2) in response to *N. ceranae*. The other responding genes were repressed, especially in the NP<sub>2:20</sub> condition, suggesting a stronger response when both stressors were combined. The result contrasted with former studies were *N. ceranae* induced the expression of some of these genes (Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014) although down regulation was also observed Tesovnik *et al.* (2020). Activation of antioxidant genes would lead to the elimination of Reactive Oxygen Species (ROS). In the gut of insects,

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function
Ubiguitination a	nd protea	some	,	, 110	,	
LOC100576667	÷1.37	×1.05	÷1.52	÷1.06	÷1.46	E3 ubiquitin-protein ligase synoviolin A
LOC410886	÷1.35	÷1.27	÷1.23	÷1.15	÷1.56	E3 ubiquitin-protein ligase UBR2
LOC411182	÷1.33	÷1.4	÷1.48	÷1.56	÷2.08	ubiquitin-protein ligase E3A
LOC411694	÷1.29	÷1.55	÷1.06	÷1.27	÷1.64	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1
LOC411797	÷1.22	÷1.09	÷1.51	÷1.35	÷1.65	protein cereblon (E3 ubiquitin ligase complex)
LOC725067	÷1.31	÷1.14	÷1.37	÷1.2	÷1.57	E3 ubiquitin-protein ligase MARCH8
LOC409386	÷1.35	÷1.09	÷1.53	÷1.23	÷1.66	ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
LOC409607	÷1.29	÷1.13	÷1.37	÷1.2	÷1.55	ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q2
LOC413822	÷1.1	×1.12	÷1.47	÷1.2	÷1.31	ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
LOC412828	÷1.22	÷1.04	÷1.42	÷1.21	÷1.48	ubiquitin C-terminal hydrolase MINDY-3 homolog
LOC100578763	÷1.21	÷1.03	÷1.44	÷1.22	÷1.48	COMM domain-containing protein 3
LOC409308	÷1.21	÷1.1	÷1.45	÷1.32	÷1.6	small ubiquitin-related modifier
LOC552336	×1.19	×1.45	÷1.24	÷1.01	×1.18	UBX domain-containing protein 1
LOC409820	÷1.03	×1.61	÷1.29	×1.29	×1.26	UBX domain-containing protein 7
LOC102654919	÷1.14	×1.4	÷1.53	×1.04	÷1.1	proteasome non-ATPase regulatory subunit 5
LOC409699	×1.25	×1.37	×1.05	×1.15	×1.45	proteasome non-ATPase regulatory subunit 1-like
LOC724642	×1.11	÷1.16	÷1.41	÷1.81	÷1.63	F-box/LRR-repeat protein 3
LOC410175	×1.42	×1.89	×1.03	×1.30	×1.85	F-box/LRR-repeat protein 14
LOC726708	÷1.19	÷1.08	÷1.37	÷1.25	÷1.48	F-box only protein 28
Proteases and pe	eptidases,	HSP chap	erones			
LOC113219265	÷1.25	÷3.6	×1.87	÷1.54	÷1.93	trypsin-1-like
LOC724565	÷1.21	×1.71	÷1.01	×2.06	×1.7	trypsin-7
LOC724308	÷2.15	÷8.36	×2.36	÷1.65	÷3.55	serine protease 53 (trypsin)
LOC410894	÷1.42	÷2.2	÷1.09	÷1.7	÷2.41	chymotrypsin-1
LOC409626	÷1.45	÷5.06	×1.45	÷2.41	÷3.5	chymotrypsin-2
LOC410729	÷1.16	÷1.47	÷1.08	÷1.37	÷1.59	putative serine protease K12H4.7
LOC725154	÷1.14	×1.8	÷1.01	×2.04	×1.79	serine protease snake
LOC726698	÷1.22	÷1.26	÷1.53	÷1.57	÷1.93	serine protease snake
LOC409178	÷1.3	÷1.19	÷1.35	÷1.23	÷1.61	ATP-dependent zinc metalloprotease YME1
LOC409341	÷1.88	÷2.09	÷1.31	÷1.45	÷2.73	lysosomal aspartic protease
LOC409517	÷1.67	÷1.46	÷1.26	÷1.1	÷1.84	digestive cysteine proteinase 1
LOC551290	÷1.17	×1.40	÷1.34	×1.23	×1.05	cathepsin Ó
LOC410289	÷1.25	÷1.18	÷1.39	÷1.31	÷1.64	paraplegin
LOC100576444	×1.04	×1.12	×1.85	×2	×2.07	chymotrypsin inhibitor
LOC725202	÷1.4	÷1.53	÷1.21	÷1.32	÷1.85	chymotrypsin inhibitor
LOC409162	÷2.09	÷1.23	×1.28	×2.16	×1.04	retinoid-inducible serine carboxypeptidase
LOC409619	÷1.25	÷2.14	×1.47	÷1.17	÷1.46	putative aminopeptidase-2
LOC411731	÷1.4	×1.08	÷1.87	÷1.24	÷1.74	endoplasmic reticulum metallopeptidase 1
LOC412232	÷1.34	÷1.13	÷1.52	÷1.27	÷1.71	dipeptidyl peptidase 3
LOC551224	÷1.36	÷1.78	×1.04	÷1.25	÷1.7	aminopeptidase N
LOC551327	÷1.54	÷1.88	×1.31	×1.07	÷1.44	carboxypeptidase B
LOC551524	÷1.32	÷1.58	÷1.11	÷1.33	÷1.75	zinc carboxypeptidase
LOC552636	×1.04	×2.44	÷1.19	×1.96	×2.04	dipeptidase 1
LOC726421	×1.38	÷1.55	×1.02	÷2.1	÷1.52	membrane metallo-endopeptidase-like 1
LOC410620	×1.61	×1.73	÷1.02	×1.05	×1.69	heat shock protein Hsp70Ab-like
LOC550968	÷1.28	÷1.29	÷1.20	÷1.21	÷1.55	heat shock protein 75 kDa (mitochondrial)

Table 2. Differentially expressed transcripts in response to *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

ROS participate in localized immune response (Broderick *et al.,* 2009). They directly impact pathogens integrity and promote their damaging but also indirectly affect their development by promoting host cell autophagy or apoptosis. Paris *et al.* (2017) used a ROS-sensitive probe to show a decrease of ROS and oxidized proteins in infected midgut but the differences were not continuously significant but at some discrete days after infection. They hypothesized that ROS decrease may result from a manipulation by the parasite to protect itself from its host. However, the production of ROS is not only toxic to the pathogens but also to the host cells. Therefore, a balance between the generation and elimination of ROS must be maintained (Broderick *et al.,* 2009) and any increase in antioxidant should be balanced with time. The global downregulation of antioxidant could be related to a time-dependent response of the honeybee, with a transient increase following the one-shot Proteus<sup>®</sup> exposure followed by a decrease after few days in the surviving honeybees.

#### G.4.3.2. The parasite-Proteus® combination affected the ubiquitin-proteasome pathway

Irreversibly damaged proteins, especially oxidized proteins, are degraded by protease activity, especially through vacuolar/lysosomal and ubiquitin-proteasome proteolysis (Costa *et al.*, 2007). The ubiquitin-proteasome pathway (UPS) involves the conjugation of multiple ubiquitin moieties to the substrate followed by the degradation of the tagged protein to short peptides by the proteasome complex. The resulting peptides are then hydrolyzed to amino acids by cytosolic proteases and aminopeptidases (Glickman and Ciechanover, 2002).

Many genes involved in the (UPS) were downregulated in NP<sub>2:20</sub> vs P but most in NP<sub>2:20</sub> vs Ct treatment, especially genes encoding E3 ubiquitin-protein ligases, ubiquitin-conjugating enzymes E2 and one ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (**Table 2**). The proteasome itself was only weakly affected, with two proteasome non-ATPase regulatory subunit genes (LOC102654919, LOC409699) down- and upregulated respectively. Previous proteomic analysis showed a decrease in the abundance of the 20S proteasomal core particle subunit alpha type-3 (LOC408986) in the midguts *Nosema*-infected honeybee (Vidau *et al.,* 2014). The same subunit was also downregulated in *N. bombycis* ovarian *Bm*N cells infected by the *Nosema bombycis* (He *et al.,* 2014).

Genes encoding proteases and peptidases were also regulated by the parasite, less by Proteus<sup>®</sup>, and more in the NP<sub>2:20</sub> vs Ct comparison. Two genes encoding chymotrypsin inhibitors were also regulated. Expression was up- or downregulated depending on stressor and on the pairwise comparison considered. Some proteases were already known to respond to *N. apis* (Malone and Gatehouse, 1998).

The regulation of UPS and proteases genes, but also heat shock proteins, suggests an affected turnover of proteins in the midgut cells, although the direction of change is not evident. The UPS and proteases play an important role in many cellular processes including regulation of cell cycle, differentiation and development, response to stress, morphogenesis of neuronal

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function
Cell cycle and pro	ogramme	d cell deat	:h			
LOC100576484	÷1.14	÷1.68	×1.05	÷1.40	÷1.59	caspase-1
LOC412235	÷1.35	÷1.02	÷1.64	÷1.24	÷1.67	caspase-1
LOC411381	÷1.19	÷1.37	÷1.28	÷1.48	÷1.76	caspase-3
LOC100578356	÷1.09	÷1.86	÷1.10	÷1.86	÷2.03	apoptotic protease-activating factor 1-like
LOC409523	÷1.44	÷1.46	÷1.40	÷1.41	÷2.03	mitogen-activated protein kinase
LOC409941	÷1.16	÷1.10	÷1.30	÷1.23	÷1.43	transmembrane GTPase Marf
LOC411472	÷1.26	÷1.27	÷1.24	÷1.25	÷1.58	dynamin-1-like
LOC725263	×1.23	×1.89	÷1.07	×1.44	×1.77	tumor protein p53-inducible nuclear protein 2
LOC552038	÷1.06	×1.63	÷1.19	×1.46	×1.37	synaptosomal-associated protein 29
LOC724873	÷1.40	÷1.15	÷1.37	÷1.12	÷1.57	ras-related protein Rab-7a
LOC409286	×1.80	×4.21	÷1.14	×2.06	×3.71	stress-activated protein kinase JNK
LOC552686	×1.50	×3.06	÷1.87	×1.09	×1.63	breast cancer metastasis-suppressor 1-like protein
LOC408790	÷1.34	÷2.28	÷1.25	÷2.12	÷2.84	protein croquemort
LOC410982 (1)	÷1.54	÷3.04	÷1.28	÷2.52	÷3.88	protein croquemort
LOC410982 (2)	÷1.18	÷1.99	×1.04	÷1.62	÷1.92	protein croquemort
LOC550698	÷1.41	÷1.19	÷1.40	÷1.18	÷1.60	cyclin Y
LOC411494	÷1.29	÷10.6	×1.86	÷4.42	÷5.68	cyclin-dependent kinase 5 activator 1
LOC725575	÷1.13	÷1.14	÷1.35	÷1.32	÷1.54	cyclin-dependent kinase 2-associated PELPK1
LOC411573	÷1.34	×1.18	÷1.48	×1.08	÷1.25	cell cycle control protein 50A
Vacuolar/lysosor	nal degra	dation				
LOC551721	÷1.45	÷1.35	÷1.26	÷1.17	÷1.70	V-type H+-ATPase subunit B
LOC411892	÷1.42	÷1.47	÷1.65	÷1.71	÷2.43	V-type H <sup>+</sup> -ATPase subunit C
LOC409946	÷1.35	÷1.46	÷1.28	÷1.39	÷1.88	V-type H+-ATPase subunit D
LOC552476	÷1.25	÷1.25	÷1.21	÷1.21	÷1.51	V-type H <sup>+</sup> -ATPase subunit F
LOC409074	÷1.36	÷1.2	÷1.45	÷1.29	÷1.75	V-type H <sup>+</sup> -ATPase 21 kDa proteolipid subunit
LOC725661	÷1.32	÷1.13	÷1.34	÷1.15	÷1.51	V-type H <sup>+</sup> -transporting ATPase S1 subunit
Vha16	÷1.34	÷1.42	÷1.10	÷1.17	÷1.56	V-type H <sup>+</sup> -ATPase 16 kDa proteolipid subunit
LOC411353	÷1.69	÷1.66	÷1.36	÷1.33	÷2.26	lipase 3
LOC551437	÷1.61	÷3.77	÷1.27	÷2.98	÷4.8	alpha-N-acetylglucosaminidase
LOC725756	÷1.17	÷2.21	×1.12	÷1.68	÷1.97	beta-galactosidase
LOC725899	÷1.37	÷2.49	÷1.21	÷2.2	÷3.01	alpha-N-acetylgalactosaminidase
LOC409341	÷1.88	÷2.09	÷1.31	÷1.45	÷2.73	lysosomal aspartic protease
LOC726315	÷1.17	÷1.38	÷1.48	÷1.73	÷2.03	sphingomyelin phosphodiesterase 1
LOC552249	÷1.29	÷2.25	÷1.33	÷2.33	÷3.00	lysosomal alpha-mannosidase
LOC412394	÷1.09	÷1.12	÷1.36	÷1.41	÷1.53	alpha-L-tucosidase
LOC409334	÷1.31	÷1.13	÷1.57	÷1.36	÷1.78	beta-mannosidase
LUC409708	÷1.04	÷1.55	÷1.14	÷1.70	÷1.77	glucosylceramidase-like
LOC409709	÷1.63	÷1.08	÷1.70	÷1.12	÷1.83	putative glucosylceramidase 4
LOC494509	÷1.32	÷1.73	÷1.11	÷1.46	÷1.93	protein Malvolio

 Table 2. Differentially expressed transcripts in response to N. ceranae and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

networks, regulation of the immune response and biogenesis of organelles (Glickman and Ciechanover, 2002). There are also interplays between ubiquitination, autophagy, an intracellular vacuolar degradation process, apoptosis and cell cycle regulation (Chen and Qiu, 2013; Low, 2006; Marino *et al.*, 2014). Many of the cited pathways had genes regulated in the present work that are discussed later. Thus, the downregulation of the UPS in the NP<sub>2:20</sub> conditions may have played a central role in the higher global response of the honeybee to the combination of stressors.

The UPS also plays proteolytic and non-proteolytic roles in the regulation of global transcription, including chromatin structure through histone ubiquitination, transcription initiation and the export of mRNA (Durairaj and Kaiser, 2014). It could by hypothesized that the global gene silencing observed in NP<sub>2:20</sub> could be linked to such transcription control but no UPS-dependent global expression silencing has been shown in the literature yet.

Protein network and ontology analyses in *D. melanogaster* associated CYPs but also the UPS pathway with insecticide resistance (Zhang and Zhang, 2018). The expression of proteasome beta2 subunit gene (LOC409978 in *A. mellifera*) was upregulated in *Drosophila* Kc cells exposed to deltamethrin and cells overexpressing or RNAi-treated to knock-down this gene showed lower and higher susceptibility to deltamethrin compared to control respectively (Hu *et al.,* 2016). Similarly, the expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2 gene was positively correlated with deltamethrin resistance of 7 generation-derived strains of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Lui *et al.,* 2017). Some proteases may also be involved in insecticide resistance (Wilkins, 2017) but there are not many proofs of direct degradation of insecticides by proteases except for deltamethrin (Yang *et al.,* 2008). All these data suggest that the UPS plays a role in insecticide detoxification. In our data, the downregulation in the NP<sub>2:20</sub> condition could reflect a reduction of detoxification capacities.

#### G.4.3.3. N. ceranae, moreover in association with Proteus®, affected cell cycle and death

As mentioned, UPS is linked to apoptosis, autophagy and cell cycle regulation, whose genes appeared differentially expressed in our data. Most of them were repressed by *N. ceranae* or in the combined treatment, suggesting alteration of cell cycle and control of programmed cell death (PCD). These genes encoded three caspases, one cyclin and two cyclin-dependent kinases and one apoptotic protease-activating factor (**Table 2**). In contrast, the autophagy-related LOC552038 (synaptosomal-associated protein 29, Morelli *et al.*, 2014) and LOC409286 (stress-activated protein kinase JNK) were activated by *N. ceranae*.

Apoptosis is a defense mechanism against intracellular parasites (Lüder *et al.,* 2001). In response, parasites have developed strategies to manipulate the host cell proliferation, development and programmed death. The percentage of apoptotic cells is significantly higher in the midgut of bees infected by *N. ceranae* (Higes *et al.,* 2013) but the repartition of apoptotic cells changes with the sensitivity of bees to the pathogen (Kurze *et al.,* 2018).
*N. ceranae* could to reduce apoptosis in sensitive honeybees by upregulating anti-apoptosis genes such as the inhibitor of apoptosis protein-(iap)-2 gene (LOC413374), *buffy* (LOC411613) and BIRC5 (LOC409405), and cyclin associated proteins (Kurze *et al.*, 2015; Martín-Hernández *et al.*, 2017). In *Bombyx mori*, the phylogenetically related *N. bombycis* suppressed apoptosis in BmN cells through the up-regulation of *buffy and* the downregulation of *cytochrome C* (CytC) and *apaf-1* (LOC100578356) and (He *et al.*, 2015). Only the last was repressed in our data together with cyclin and caspase associated genes (**Table 2**). CytC was not regulated but most mitochondrial related genes were downregulated. Neurotoxic insecticides also induce apoptosis. Amitraz triggers apoptosis in the columnar and regenerative epithelial cells of the midgut of honeybee larvae after 24h (Gregorc and Bowen, 2000). But cell death decreased 48 h after treatment, suggesting a transient response. Thiamethoxam and *N. ceranae* both induced apoptosis in honeybee midgut but their interaction seemed antagonist, with less apoptotic cells than in midgut exposed to one treatment only (Gregorc *et al.*, 2016). We did not observe such interaction in transcriptome profiles but a clear downregulation in response to the combined insecticide-parasite treatment suggesting a reduced program cell death.

Autophagy, an intracellular vacuolar degradation process, may also be a defense pathway against intracellular parasites. In the tardigrade *Isohypsibius granulifer* more intense autophagy was observed in the digestive cells of the midgut that were infected with microsporidia (Rost-Roszkowska et al., 2013). In contrast to our data, ubiquitin ligase complex components were upregulated in the nematode Caenorhabditis elegans infected with the microsporidian Nematocida parisii (Reddy et al., 2017) and host strain resistance was correlated with higher ubiquitination of Nematocida ironsii in first larval stage (Balla et al., 2019). RNAi knock-down expression of component of UPS or autophagy components resulted in higher levels of N. parissi load. Ubiquitination of parasite the by the host allowed controlling the infection by and promoting parasite clearance by the mean of autophagy. However, the parasite evades actively ubiquitination and is weakly tagged in late infection stage (Bakowski et al., 2014; Balla et al., 2019), possibly involving its own cell wall deubiquinating activities (Wang et al., 2015). In the present work the downregulation of autophagy and vacuolar genes, including V-type proton pump ATPase subunits, was in accordance with the less abundant V-ATPase subunit B (LOC551721) observed in proteomic analysis (Vidau et al., 2014). This downregulation could reflect a failure of the host to control the late infection (16 days after infection) or a parasite manipulation of the host to promote its development.

### G.4.3.4. Proteus<sup>®</sup> alone may affect the visceral muscle integrity

Autophagy and apoptosis trigger the loss of cell and tissue integrity. The present strongly suggested that Proteus<sup>®</sup> upregulated genes involved in cell-cell or cell-matrix adhesion. For instance, Proteus<sup>®</sup> upregulated many genes involved in cytoskeleton structure and regulation, including components of the intermediate (keratin, trichohyalin) and actin filaments (actin, myosin) (**Table 2**). Proteus<sup>®</sup> also induced the expression of gene related to

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function	
Cytoskeleton and adhesion							
LOC100577397	×1.61	×1.19	×1.32	÷1.03	×1.57	trichohyalin	
LOC102654166	×2.41	÷1.06	×2.13	÷1.2	×2.01	trichohyalin	
LOC724737	×1.73	×1.88	×1.12	×1.21	×2.1	trichohyalin	
LOC725309	÷1.67	÷2.14	÷1.32	÷1.69	÷2.83	keratin-associated protein 19-2	
LOC107965005	÷1.55	×2.65	÷1.52	×2.70	×1.15	keratin-associated protein 19-2	
LOC551176	×2.24	×1.2	×1.24	÷1.51	×1.49	actin, clone 205	
LOC551369	×1.63	×1.11	×1.24	÷1.18	×1.37	actin, clone 205	
LOC100577498	×2.35	×1.1	×1.33	÷1.6	×1.46	actin cytoskeleton-regulatory complex protein PAN1	
LOC551706	×1.74	÷1.6	×1.17	÷2.38	÷1.37	unconventional myosin-IXb	
LOC552299	÷1.32	÷1.13	÷1.36	÷1.16	÷1.53	myosin-IA	
LOC408740	×2.34	×1.98	×1.03	÷1.15	×2.04	phosphatase and actin regulator 20	
LOC408429	×2.23	×1.83	×1.14	÷1.07	×2.08	tensin-3 isoform X8	
LOC409051	×2.62	×1.55	×1.69	×1	×2.63	ankyrin-3 isoform X8	
LOC410368	×1.45	×1.27	×1.74	×1.51	×2.2	cadherin-23	
LOC725169	÷1.14	÷1.13	÷1.30	÷1.29	÷1.48	contactin	
LOC725098	×2.53	×1.63	×1.02	÷1.51	×1.67	tight junction protein ZO-2	
Muscle							
LOC409821	×3.45	×1.07	×3.12	÷1.04	×3.34	twitchin isoform X9	
LOC551259 (1)	×3.36	×2.4	×1.42	×1.01	×3.39	titin6	
LOC551259 (2)	×3.09	×2.04	×1.3	÷1.17	×2.65	titin6	
LOC725936	×2.65	×1.6	×1.4	÷1.19	×2.23	titin homolog	
LOC724192	×1.19	×1.55	×1.03	×1.34	×1.6*	titin	
LOC411285	×1.50	×1.17	×1.18	÷1.09	×1.38	muscle LIM protein Mlp84B	
LOC409843	×2.32	×1.14	×1.37	÷1.48	×1.57	myosin heavy chain, muscle 1	
Tpnl (1)	×1.73	÷1.3	÷1.21	÷2.7	÷1.57	troponin I8	
Tpnl (2)	×2.29	×1.66	×1.09	÷1.26	×1.82	troponin I8	
Tpnl (3)	×2.19	×1.02	×1.5	÷1.43	×1.53	troponin I8	
TpnT (1)	×3.75	×2.11	÷1.03	÷1.83	×2.05	troponin T, skeletal muscle	
TpnT (2)	×2.73	×1.31	×1.37	÷1.52	×1.79	troponin T, skeletal muscle	
TpnCllla	×1.69	÷1.02	×1.16	÷1.49	×1.13	troponin C type Illa	
LOC408830	×2.09	×1.09	×1.85	÷1.04	×2.02	obscurin isoform X7	
LOC102653748	÷1.11	÷2.14	÷1.43	÷2.78	÷3.07	myostatin (growth/differentiation factor 8)	
LOC410058	×1.47	÷1.00	÷1.02	÷1.50	÷1.02	myosin light chain alkali	
LOC409881	×1.43	×1.08	×1.00	÷1.32	×1.08	myosin regulatory light chain 2	

Table 2. Differentially expressed transcripts in response to *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

cell adhesion, encoding tensin-3, cadherin-23 and tight junction protein ZO-2. The parasite affected only few of those genes. These changes may illustrate changes in the midgut epithelium cellular and tissular structure.

Another hypothesis may be proposed as we observed the upregulation of striated muscle genes by Proteus<sup>®</sup>. Upregulated genes include troponins, titins and homologs, twitchin, obscurin, the LIM protein Mlp84B and the previously cited actin and myosin encoding genes that are essential for muscle sarcomeres. All insect muscles are striated (Douglas, 2012) and the honeybee midgut is covered by two layers of visceral muscles with inside circular muscles and outside longitudinal muscles. Deltamethrin and neonicotinoids cause hyperexcitation of the nervous system (Casida and Durkin, 2013) and have known effect on locomotor muscle activity (Charreton *et al.*, 2015; Tosi *et al.*, 2017a). Our data strongly suggest that they also affect the gut visceral muscles. Aljedani *et al.* (2017) showed that oral exposure to deltamethrin altered the epithelial cells to become contiguous on their striated border but also changed the organization of the muscles surrounding the midgut that became separated from the basal membrane. So not only the activity but also the visceral muscle structure could be affected.

The upregulation of genes was very clear in  $P_{2:20}$  vs Ct but reduced in the NP<sub>2:20</sub> vs Ct and absent or inverted in the NP<sub>2:20</sub> vs N pairwise comparison. There was a counteracting effect of the parasite although it did not affect the expression of the genes alone. Noteworthy, the counteracting effect of the parasite was more general, with an upregulation of cell and muscle structure related genes and a weak regulation of UPS, autophagy and apoptosis genes in response to Proteus<sup>®</sup> alone, but a weak regulation of the former and strong downregulation of the laters in response to NP<sub>2:20</sub>.

### G.4.3.5. N. ceranae and Proteus® altered the midgut tissue integrity

Besides cell structure, extracellular matrices genes, which play multiple roles in tissue integrity were also regulated, mostly activated, but differently upon stress conditions. Proteus<sup>®</sup> alone upregulated collagen alpha chains and spondin-1 and *N. ceranae* alone a laminin subunit and mucin-1 (**Table 2**). Depending on the combination tested, other genes were differentially expressed, such as Apd-2 (apidermin 2) that was divergently regulated, repressed by both stressors alone, repressed by both in the presence of the other. The combined treatment regulated the expression of 5 cuticular proteins, including two analogs to peritrophins, and upregulated by *N. ceranae* (Badaoui *et al.*, 2017). The midgut lumen is not lined with cuticle but with a peritrophic matrix that contains chitin and proteins. Previous studies depicted hypertrophic enlargement and evidence of degeneration, with vacuolization and lysis, of epithelial cells infected by *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007; Dussaubat *et al.*, 2012 Gregorc *et al.*, 2016). In transcriptome data, this degeneration seemed related to cell cycle control, autophagy, apoptosis as well as the regulation of extracellular cuticular

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function
Extracellular matrices, basal lamina, tegument						
Apd-2	÷4.39	÷3.82	×6.2	×7.12	×1.62	apidermin 2 precursor
Cpap3-b	×1.79	×1.82	×1.24	×1.26	×2.26	cuticular protein analogous to peritrophins 3-B
Cpap3-d	×1.15	÷1.01	÷2.21	÷2.57	÷2.23	cuticular protein analogous to peritrophins 3-D
CPR14	×1.36	÷1.35	÷2.59	÷4.77	÷3.51	cuticular protein 14 precursor
CPR22	÷1.15	÷1.47	÷2.56	÷3.28	÷3.76	cuticular protein 22 precursor
LOC107964828	×1.28	×1.66	×1.31	×1.7	×2.18	cuticle protein 19
LOC408874	÷1.18	×4.02	÷1.17	×4.05	×3.45	chitinase
LOC413481	÷1.04	×2.59	×1.73	×4.65	×4.47	chitinase 10
LOC100577725	×2.17	÷3.93	×18.1	×2.12	×4.6	chitinase 10
LOC413705	÷1.9	÷1.86	÷1.44	÷1.41	÷2.67	acidic mammalian chitinase
LOC408551	×1.95	÷1.1	×1.55	÷1.39	×1.4	collagen alpha-5(IV) chain
LOC411296	÷1.31	÷2.24	×1.51	÷1.13	÷1.48	silk gland factor 1
LOC412865	×2.21	×1.25	×1.82	×1.03	×2.27	collagen alpha-2(IX) chain1
LOC408552	×1.53	÷1.30	×1.59	÷1.25	×1.22	collagen alpha-1(IV) chain
LOC726736	÷1.10	×1.77	÷1.39	×1.40	×1.28	laminin subunit beta-1
LOC551924	÷1.59	×2.75	÷1.14	×3.83	×2.42	mucin-1 isoform X7
LOC551924 (1)	×1.08	×3.71	÷1.49	×2.3	×2.48	mucin-1 isoform X7
LOC410824 (2)	×2.39	×1.23	×1.56	÷1.25	×1.91	spondin-1
LOC724421	×1.35	÷2.53	×8.1	×2.38	×3.21	fibrillin-2
LOC408874	÷1.18	×4.02	÷1.17	×4.05	×3.45	uncharacterized protein LOC408874 isoform X7
Immunity						
Def1	×2.54	×3.42	÷3.68	÷2.73	÷1.08	defensin-1 preproprotein
LOC406144	×1.17	÷1.68	×1.09	÷1.81	÷1.54	abaecin precursor
LOC410747	÷1.78	÷9.94	×1.49	÷3.75	÷6.66	glucose dehydrogenase
LOC100578995	÷1.44	÷2.37	÷1.36	÷2.24	÷3.22	vanin-like protein 1
LOC413631	÷1.46	×1.18	÷1.85	÷1.07	÷1.56	vanin-like protein 1
LOC724312	÷1.69	×1.56	÷1.12	×2.34	×1.38	vanin-like protein 1
Tsf1	÷2	÷1.1	÷2.32	÷1.28	÷2.56	transferrin 1 precursor
LOC409187	×5.17	÷2.25	×12.6	×1.08	×5.6	MD-2-related lipid-recognition protein
LOC725158	÷1.44	÷2.07	×1.09	÷1.32	÷1.9	peptidoglycan-recognition protein 1
Pgrp-s2	×1.02	÷2.78	÷1.17	÷3.34	÷3.26	peptidoglycan-recognition protein S2

 Table 2. Differentially expressed transcripts in response to N. ceranae and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

proteins and chitinases (Dussaubat *et al.,* 2012). By altering the epithelium and the peritrophic matrix, the stressors may reduce the physical barriers that constitute the first defense against pathogens.

#### G.4.3.6. N. ceranae and insecticides may have contrasted effect on immunity

The response of the insect midgut to pathogens comprises physical barriers, production of ROS, epithelium renewal in response to gut damage and the activation of the immune system including the secretion of antimicrobial peptides (AMPs) (Kuraishi et al., 2013). The expression of the AMP abaecin was repressed in infected midguts (Table 2). The AMP defensin-1 (Def1) gene was one of the few genes that diverged in response upon combination of stressors. Its expression was activated by Proteus® and N. ceranae alone but repressed when the other stressors was present. The expression of glucose dehydrogenase, a component of the humoral immunity associated with melanization, was repressed by both stressors. Among genes involved in bacterial wall recognition and signaling, two peptidoglycan-recognition proteins were downregulated by N. ceranae while the MD-2related lipid-recognition protein (Shi et al., 2012) was upregulated by Proteus<sup>®</sup>. Transferrin 1 and vanins may be linked to both detoxification and immunity. Three vanin genes were repressed by the insecticide, two of them were also up- or down-regulated by the parasite. Such changes in expression, but not always similar, were already observed in infected midgut (Antúnez et al., 2009; Aufauvre et al., 2014), including vanin-like protein that mediate oxidative burst in the epithelium (Nikolenko et al., 2012). There were also observed in response to combination of thiamethoxam and *N. ceranae* (Tesovnik et al., 2020). Pesticides are also thought to increase the honeybee susceptibility towards pathogens especially through immunity (O'Neal et al., 2018). Oral exposure to thiacloprid reduced the hemocyte number and antimicrobial activity in the hemolymph and reduced the encapsulation of exogenous Nylon filament (Brandt et al., 2017). A reduction of phagocytosis was observed in larval hemolymph exposed to the neonicotinoid imidacloprid (Walderdorff et al., 2018). Thus, the combination of pesticide and parasite ought to be detrimental for the host.

As said, immunity involves a large panel of host responses, including physical barriers, ubiquitination of the parasite promoting its clearance by autophagy, ROS production, proteolytic activities and programmed cell death. Moreover, signaling interplays connect these pathways. ROS and UPS are critical for regulating the transcription factor NF- $\kappa$ B, therefore immunity and cell proliferation (Piva *et al.*, 2006). Serine proteases participate in the regulation of innate immunity (Zou *et al.*, 2006; Kanost and Clem, 2012). Thus, all the responses discussed until now seem interconnected but all tend to protect the honeybee against stressors although the parasite may have developed adaptations to escape some of these defenses.

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function	
Carbohydrate metabolism (incl. glycolysis, pentose phosphate, starch metabolism)							
LOC410484 (1)	÷1.71	÷5.83	×1.03	÷3.33	÷5.68	trehalase	
LOC410484 (2)	÷1.13	÷3.91	×1.09	÷3.17	÷3.58	trehalase	
LOC408867	÷1.9	÷1.75	÷1.03	×1.05	÷1.8	α,α-trehalose-phosphate synthase	
LOC102655622	÷1.24	÷1.4	÷1.29	÷1.46	÷1.81	facilitated trehalose transporter Tret1	
LOC412797	÷1.76	÷1.26	÷2.52	÷1.8	÷3.17	facilitated trehalose transporter Tret1	
LOC413575	÷1.14	÷1.67	÷1.15	÷1.7	÷1.93	facilitated trehalose transporter Tret1	
LOC413576	÷1.45	÷1.87	÷1.18	÷1.52	÷2.2	facilitated trehalose transporter Tret1-2 homolog	
LOC726839 (1)	÷1.2	÷2.18	÷1.35	÷2.47	÷2.95	facilitated trehalose transporter Tret1	
LOC726839 (2)	×1.26	÷1.49	÷1.17	÷2.2	÷1.74	facilitated trehalose transporter Tret1	
LOC408818	÷1.57	÷1.58	÷1.47	÷1.49	÷2.33	hexokinase-1 <sup>G</sup>	
LOC726522	÷1.22	÷1.25	÷1.24	÷1.27	÷1.55	ketohexokinase	
LOC551154	÷1.25	÷1.47	÷1.16	÷1.36	÷1.71	glucose-6-phosphate isomerase <sup>G</sup>	
LOC411897	÷1.96	÷1.67	÷1.6	÷1.36	÷2.66	phosphoglucomutase <sup>G</sup>	
100413336	÷1 38	÷1 07	÷1.56	÷1 21	÷1.67	ADP-dependent glucokinase <sup>G</sup>	
100410122	÷1 39	$\pm 1.07$	÷1 41	÷1 11	÷1 54	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 <sup>G</sup>	
100552678	÷1 31	÷1 25	÷1 20	$\pm 1.14$	÷1.51	enolase G	
100/11188	×1 51	×3 35	×1 11	×2 44	×3.7	L-lactate dehydrogenase G	
100411202	÷1 27	+1.06	÷1 15	÷1 70	÷2.27	1 5 anhydro D fructoso roductaso G	
100550697	÷1.27	+1.50	÷1.15	÷1.79	÷2.27	aldehude dehudrogenase*G	
	÷1.50	÷1.05	÷1.25	-1.40	+2.04	transkatalasa	
LOC550804	÷1./	÷1.98	÷1.25	÷1.46	÷2.48	transketolase	
LOC550804	÷1.47	÷1.54	÷1.56	÷1.62	÷2.39	transketolase	
LUC551447	÷1.51	÷1.24	÷1.32	÷1.09	÷1.64	mannose-6-phosphate isomerase	
LOC409963	÷0.90	÷1.18	÷1.29	÷1.68	÷1.52	6-phosphotructo-2-kinase	
LOC4088/1	÷1.35	÷1.60	÷1.13	÷1.33	÷1.81	sorbitol dehydrogenase	
LOC406114	÷1.74	÷7.6	×1.05	÷4.15	÷7.24	alpha-amylase precursor	
LOC409693	÷1.27	÷1.57	÷1.29	÷1.6	÷2.03	inositol monophosphatase 1	
LOC411365	×1.01	÷2.18	×1.23	÷1.8	÷1.78	beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase bre-4	
LOC411978	÷6.16	÷2.1	÷2	×1.46	÷4.2	myrosinase 1	
LOC413043	÷1.4	÷2.28	×1.14	÷1.43	÷2.01	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	
LOC551282	÷1.20	÷1.50	÷1.23	÷1.54	÷1.84	ribokinase	
LOC551986	÷1.05	÷1.15	÷1.30	÷1.42	÷1.49	deoxyribose-phosphate aldolase	
Oxidative phosp	horylatior	1 and enei	rgy metab	olism († To	CA, <sup>cl-cV</sup> cor	mplexes, * in mitochondria, * mitochondrial gene)	
LOC413014	×1.01	×1.44	÷1.23	×1.15	×1.17	NADH dehydrogenase $1\alpha$ subcomplex subunit $5^{cl*}$	
LOC409473	÷1.12	÷1.25	÷1.28	÷1.43	÷1.60	NADH dehydrogenase 1α subcomplex subunit 8 <sup>ci</sup> *	
ND4L <sup>¶</sup>	÷2.75	÷1.52	÷1.71	×1.06	÷2.59	NADH dehydrogenase subunit 4L <sup>ci*</sup>	
Ndufs1	÷1.36	÷1.35	÷1.26	÷1.25	÷1.70	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75kDa subunit <sup>cl*</sup>	
LOC100302106	÷1.15	÷1.13	÷1.44	÷1.42	÷1.63	NADH dehydrogenase MNLL subunit <sup>ci</sup> *	
LOC725566	÷1.23	÷1.17	÷1.36	÷1.28	÷1.58	succinate dehydrogenase cyt.b small subunit <sup>cll*</sup>	
LOC408734	×1.36	×1.34	×2.34	×2.29	×3.13	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit <sup>cli*</sup>	
LOC552671	÷1.31	÷1.22	÷1.34	÷1.25	÷1.63	cytochrome b-c1 complex subunit 2 <sup>clll</sup> *	
LOC100578782	÷1.24	÷1.09	÷1.52	÷1.33	÷1.65	cytochrome b-c1 complex subunit 9 <sup>clll</sup> *	
LOC726341	÷1.22	×1.06	÷1.5	÷1.16	÷1.42	ubiquinol-cyt.c reductase assembly factor 1 cll *	
LOC408837	÷1.24	÷1.22	÷1.31	÷1.28	÷1.59	cvtochrome c oxidase subunit 5A civ*	
Cox6b1	÷1.14	÷1.09	÷1.52	÷1.46	÷1.66	cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 <sup>cIV*</sup>	
10C102655540	÷1.35	÷1.06	÷1.54	÷1.2	÷1.62	cytochrome c oxidase assembly protein COX19 <sup>cIV*</sup>	
100552699	÷1 28	÷1 37	÷1 30	÷1 38	÷1 77	ATP synthase subunit gamma <sup>cV*</sup>	
100411014	÷1.20	÷1 35	÷1 12	÷1 20	÷1 52	malate dehydrogenase <sup>T</sup>	
100551276	÷1 36	÷1 20	÷1.12	÷1.20	÷1.52	NADP-dependent isocitrate debudrogenase <sup>T</sup>	
100/00202	÷1.30	÷1.25	÷1.42	÷1.34	÷1.02	isocitrate debydrogenase subunit a *I	
100403232	.1.21	.1.15	.1.22	.1.20	•1.45	isositrate dehydrogenase subunit & *T	
LOC410590	÷1.59	-1.15	-1.40	-1.25	$\pm 1.70$	isocitiate delividogenase suburit 0 *	
LUC552128	÷1.31	÷1.11	÷1.30	÷1.10	÷1.44	Isocitrate denydrogenase subunit p **	
	÷1.30	÷1.28	÷1.26	÷1.25	÷1.62	2-oxogiutarate denyarogenase complex component *	
LUC552016	÷1.33	÷1.43	÷1.45	÷1.55	÷2.07	2-oxogiutarate/maiate carrier protein*	
LOC410289	÷1.25	÷1.18	÷1.39	÷1.31	÷1.64	Parapiegin*	
LOC410042	÷1.37	÷1.4	÷1.51	÷1.53	÷2.1	glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	
Ant	÷1.41	÷1.44	÷1.18	÷1.20	÷1.70	ADP/ATP translocase*	
LOC410059	÷1.37	÷1.58	÷1.26	÷1.45	÷1.99	probable citrate synthase 2* <sup>⊤</sup>	

Table 2. Differentially expressed transcripts in response to *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

### G.4.3.7. *N. ceranae* affected sugar and energy metabolism and oxidative phosphorylation was impaired by the combined parasite-Proteus<sup>®</sup> treatment

N. ceranae relies on its host for its energetic and metabolic needs. It lacks genes for tricarboxylic acid cycle, fatty acid  $\beta$ -oxidation, and respiratory electron-transport chain (Paldi et al., 2010; Pan et al., 2013). Many metabolic genes responded to stressors in our data, the most striking results were 1) the global downregulation of carbohydrate metabolism (pentose phosphate, glycolysis...) in infected midguts and 2) the downregulation of the respiratory chain, together with other proteins localized in the mitochondria, in the NP2:20 vs Ct comparison (Table 2). Among carbohydrates, trehalose metabolism appeared particularly affected by the parasite, with the downregulation of genes encoding the trehalase and three trehalose, another transporter being significantly repressed in the NP<sub>2:20</sub> vs Ct comparison. Among the other carbohydrate metabolic genes repressed by N. ceranae, many were linked to glucose and fructose metabolism (e.g. hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, glucokinase, transketolase, 6-phosphofructo-2-kinase). Almost all of the ca. 60 genes with annotated functions related to mitochondria were downregulated, mostly comparing NP<sub>2:20</sub> to Ct. The effect of the combined treatment was particularly clear on the oxidative phosphorylation pathway. Except LOC408734 and LOC413014 (subunits of respiratory complexes I and II), twelve transcripts encoding subunits of complexes I to V (Table 2) and two accessory proteins were repressed. This included the ND4L gene that is encoded in the mitochondrial honeybee genome. Oxidative phosphorylation was the sole clear functional group clearly enriched in the NP<sub>2:20</sub> vs Ct comparison. Isocitrate and succinate metabolic genes were also regulated.

Previous analyses also showed a regulation of the expression of metabolic genes as well as the lower abundance of the NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5 in whole infected honeybees or in their midgut (Aufrauvre et al., 2014; Vidau et al., 2014, Badaoui et al., 2017). In their hemolymph, infected foragers show lower trehalose levels and a faster rate of trehalose decline than uninfected ones but only under starvation (Mayack and Naug, 2010). Glucose level was maintained. Trehalose level in the hemolymph is negatively associated with N. ceranae infection in sensitive but not in tolerant honeybees (Kurze et al., 2016). Single oral exposure to the neonicotinoids clothianidin and thiamethoxam also induced an energetic stress but only for honeybees fed with a low concentration of sucrose (Tosi et al., 2017b). The insecticides also induced a decrease in trehalose and glucose in the hemolymph. In insects, glucose is stored into the circulating trehalose and to glycogen and triglycerides, especially stored in the fat body (Arrese and Soulages 2010; Yamada et al., 2018). Under starvation, trehalose level in the hemolymph may decrease to maintain glucose homeostasis, depending on the mobilization of fat body glycogen but also on the metabolic rate (Blatt and Roces, 2001). The downregulation of trehalose related enzymes and transporters in infected midguts (**Table 2**, Aufauvre *et al.*, 2014) suggest that there is no need for higher trehalose or other carbohydrates and that there was no energetic stress in our

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function		
Lipid metabolism (incl. fatty acid, glycerophospholipid)								
LOC412815	÷1.53	×1.41	÷2.02	×1.07	÷1.43	fatty acid synthase		
LOC413655	÷1.21	÷1.11	÷1.40	÷1.29	÷1.55	oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase, mitochondrial		
LOC411662	÷1.20	÷1.11	÷1.30	÷1.20	÷1.44	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase, mitochondrial		
LOC551775	÷1.18	÷1.32	÷1.25	÷1.40	÷1.65	trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial		
LOC725031	÷1.49	×1.09	÷2.03	÷1.25	÷1.86	elongation of very long chain fatty acids protein 6		
LOC412166	÷1.27	×1.35	÷1.61	×1.07	÷1.19	acyl-CoA Delta(11) desaturase		
LOC725258	÷1.38	÷1.86	÷1.04	÷1.4	÷1.93	very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase		
LOC726040	÷2.44	÷2.76	×1.32	×1.17	÷2.09	4-coumarate-CoA ligase 1/Acyl-CoA synthetase		
LOC726362 (1)	÷1.77	÷2.94	÷1.21	÷2.01	÷3.56	4-coumarate-CoA ligase 1/Acyl-CoA synthetase		
LOC726362 (2)	÷1.84	÷2.59	÷1.32	÷1.86	÷3.42	4-coumarate-CoA ligase 1/Acyl-CoA synthetase		
LOC726798	×1.5	÷1.07	÷2.2	÷3.53	÷2.35	sn1-specific diacylglycerol lipase beta		
LOC727037	×1.03	×4.2	÷1.81	×2.25	×2.32	phospholipase A1 member A		
LOC725119	÷1.35	÷1.10	÷1.54	÷1.25	÷1.69	phospholipase D2		
LOC411353	÷1.69	÷1.66	÷1.36	÷1.33	÷2.26	lipase 3		
LOC113219028	÷1.27	÷3.34	÷1.18	÷3.08	÷3.92	pancreatic triacylglycerol lipase-like		
Fabp (1)	÷1.36	×2.17	÷1.18	×2.5	×1.84	fatty acid binding protein		
Fabp (2)	÷2.15	÷1.37	÷1.37	×1.15	÷1.88	fatty acid binding protein		
LOC100578329	÷1.13	×1	×2.32	×2.62	×2.32	fatty acyl-CoA reductase wat		
LOC724560	×1.09	÷1.07	×2.79	×2.38	×2.6	fatty acyl-CoA reductase 1		
LOC552286	÷1.08	÷1.70	×1.02	÷1.54	÷1.66	acetyl-CoA carboxylase		
LOC725187	÷1.32	÷1.42	÷1.22	÷1.31	÷1.73	putative fatty acyl-CoA reductase CG8306-like		
LOC408809	×1.69	×1.49	÷1.03	÷1.17	×1.45	diacylglycerol kinase theta		
LOC724907	×1.32	÷2.03	×1.14	÷2.36	÷1.78	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha		
LOC552688	÷1.56	÷1.42	÷1.22	÷1.10	÷1.73	acyl-CoA:lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1		
A4	×2.64	÷2	×15.2	×2.87	×7.59	apolipophorin-III-like protein precursor		
LOC408961	÷1.3	÷2.94	×2.78	×1.23	÷1.06	apolipophorin		
LOC409465	÷1.09	×2.03	÷1.06	×2.09	×1.91	homolog to Drosophila lipid storage droplet-1		
LOC408564	÷1.51	÷1.45	÷1.12	÷1.07	÷1.6	long-chain fatty acid transport protein 4		

 Table 2. Differentially expressed transcripts in response to N. ceranae and/or Proteus<sup>®</sup>. (continued...)

experiment. This could be due to caging conditions were honeybee were fed *ad libitum* and did not experiences starvation. It could also be related to a general decay of metabolic activity of the midgut as we observed a clear downregulation of the oxidative phosphorylation genes, hence of the metabolic respiratory capacity.

In Bombys mori BmN cells infected with N. bombycis spores, the abundance of proteins involved in energy synthesis, including H<sup>+</sup> transporting ATP synthase subunit d, increased after 48 hpi and their expression continued to increase after 96 h (He et al., 2014). In rat macrophages, the fish microsporidian Microgemma caulleryi modulates the respiratory burst, also reducing ROS production (Leiro et al., 2001). Thus, infection would induce the host energy metabolism as both a source of ATP and as a consequence of energetic needs for defense. Such response is far less clear following pesticide exposure, were results differed upon the applied molecule and/or the considered organ. Oxidative phosphorylation genes were regulated in response to an oral thiamethoxam treatment in whole honeybees (Shi et al., 2017). Oxidative phosphorylation proteins were more abundant in whole honeybees orally treated with nicotine, suggesting an energetic cost of detoxification (duRand et al., 2015). In pyrethroid resistant Anopheles sinensis oxidative phosphorylation genes were mutated of regulated compared to sensitive individuals (Ding et al., 2019). In contrast, such genes were repressed after an oral exposure to fungicides in the honeybee brain (Christen et al., 2019). At the subcellular level, imidacloprid and the phenylpyrazole fipronil reduced the respiration rate, measured as O<sub>2</sub> consumption, and the ATP production of mitochondria isolated from honeybee heads and thoraces in a dose-dependent manner (Nicodemo et al., 2014). However, these substances did not act as uncouplers dissociating ATP synthesis from the electron transport chain as initially suggested by Vidau et al. (2011b) in human cells, where fipronil also induced an increase in  $O_2$  consumption, a decrease in ATP and an increase in lactate production, suggesting an increase of glycolysis. Here we did not observe a clear increase in expression of glycolysis related genes. In mitochondria from rat brain intensities of cytochrome c and activity of cytochrome c oxidase were reduced by deltamethrin resulting in a decreased mitochondrial membrane potential and increased permeability (Chen et al., 2007), that are the primary events of apoptosis (Plenchette et al., 2004). The downregulation in NP<sub>2:20</sub> could reflect a control of apoptosis by the parasite, a recovery of the honeybee following an energetic burst immediately after pesticide exposure or a specific response to the combined Proteus<sup>®</sup>-*N. ceranae* treatment that reduced the activity of the honeybee.

#### G.4.3.8. Lipid metabolism

Numerous genes involved in lipid metabolism were regulated in response to *N. ceranae* and/or Proteus<sup>®</sup> including genes involved in both fatty acid biosynthesis and lipid degradation (**Table 2**). Genes were positively or negatively regulated upon stressor and stronger in double treatment. Lipid metabolic genes were shown to respond to the infection (Badaoui *et al.,* 2017). Lipids are involved in energy metabolism, reflecting energy reallocation, but they are

Gene	P <sub>2:20</sub> /Ct	N /Ct	NP <sub>2:20</sub> /N	NP <sub>2:20</sub> / P <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> /Ct	Protein function	
Nervous system, synapse plasticity and behaviour							
LOC409791	×2.81	×2.47	×1.24	×1.09	×3.07	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1	
LOC410228	×1.12	÷3.16	÷1.03	÷3.63	÷3.24	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 3	
LOC410562	×2.2	×1.46	×1.54	×1.02	×2.24	serine/threonine-protein kinase Meng-Po	
LOC409207	×1.28	×1.85	÷1.2	×1.21	×1.55	synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	
LOC409924	÷1.47	÷1.53	÷1.15	÷1.2	÷1.77	synaptic vesicle glycoprotein 2B	
LOC411186 (1)	÷1.49	÷3.2	×1.41	÷1.52	÷2.27	synaptic vesicle glycoprotein 2C	
LOC411186 (2)	×1.31	÷1.61	÷1.09	÷2.29	÷1.75	synaptic vesicle glycoprotein 2C	
LOC413739	÷1.7	÷1.92	÷1.3	÷1.47	÷2.5	synaptic vesicle glycoprotein 2C	
LOC412220	÷3.71	÷2.57	÷2.09	÷1.45	÷5.3	vesicular glutamate transporter 2.2	
LOC724172	×1.79	×1.40	÷1.07	÷1.37	×1.30	neurobeachin7	
LOC552447	÷1.33	×1.51	×1.02	×2.04	×1.53	clavesin-2	
LOC410101	÷1.30	÷2.22	×1.02	÷1.66	÷2.17	trafficking kinesin-binding protein milt	
LOC410479	÷3.5	×1.03	×2.22	×8.01	×2.29	zwei Ig domain protein zig-8	
LOC409849	×1.56	×1.41	×1.49	×1.34	x2.10	fasciclin-2	
LOC726283	÷1.01	÷1.96	÷1.09	÷2.12	÷2.15	neuronal calcium sensor 2	
LOC552329	÷1.40	÷1.07	÷1.67	÷1.28	÷1.79	Choline transporter-like protein 1	
LOC726924	×1.57	×2.07	÷1.01	×1.31	×2.04	synapse-associated protein of 47 kDa	
NLG-3	×1.97	×1.27	×1.21	÷1.28	×1.54	neuroligin 3 precursor	
LOC100576163	÷1.32	÷1.95	÷1.61	÷2.39	÷3.15	short neuropeptide F	
Ecr	×1.34	×1.5	×1.37	×1.53	×2.06	ecdysone receptor isoform B1	
LOC724216	÷1.22	÷2.24	÷1.06	÷1.94	÷2.37	juvenile hormone acid O-methyltransferase	
LOC408559	÷1.30	÷1.36	÷1.30	÷1.36	÷1.77	retinal dehydrogenase 1	
LOC406152	÷1.45	÷1.13	÷1.44	÷1.12	÷1.62	juvenile hormone epoxide hydrolase 1	

Table 2. Differentially expressed transcripts in response to N. ceranae and/or Proteus®. (end)

also constituents of cell membranes, affecting the activity of associated proteins, and they are thought to take part in the immune response. Viral and bacterial infections induce an increase in lipid content, especially in lipid droplets, in the midgut of insects that can be mimicked upon genetic activation of immune signaling pathways, linking the host lipid content with its immune response (Barletta et al., 2016; Chotiwan et al., 2018; Harsh et al., 2019). Here, the microsporidian parasite is also metabolically dependent on its host. Tubulinosema ratisbonensis, a microporidian infecting primarily the fat body of D. melanogaster, depletes the host metabolic stores and fatty acid is the limiting factor for its proliferation (Franchet et al., 2019). Microsporidia lack genes to use long-chain fatty acids that first need to be shortened by the host metabolism (Nakjang et al., 2013). Phosphatidic acid may be the compound hijacked by *T. ratisbonensis*. According to KEGG orthology, 4 genes encoding enzyme related to phosphatidic acid as substrate or product (LOC408809, LOC725119, LOC551231, LOC724907) were regulated in our data. Interestingly, LOC411353 (lipase 3), LOC408961 (apolipophorin), LOC409465 (droplets surface-binding protein), LOC552286 and LOC412815 (required for the synthesis of phosphatidic acid) have homologs in D. melanogaster that showed reduced parasite load and increased survival in infected flies when knock-down by RNAi (Franchet et al., 2019). Thus, the regulation of lipid-related genes could be linked to the need of the parasite as well as the immune response of the host.

It has been shown that insecticides, such as imidacloprid, also regulated the transcription of fatty acid metabolizing genes in honeybee larvae (Derecka *et al.*, 2013). Moreover, imidacloprid induced changes in the levels of various lipids (including one glycerophosphate to which belongs phosphatidic acid) that include both constituents of membranes and compounds involved in energy metabolism. We also observed the regulation of such genes in response to Proteus<sup>®</sup>, *e.g.* the activation of two apolipophorin genes. Lipophorins, that comprise two glycosylated apolipoproteins, play an important role in lipid transport and insect innate immunity (Zdbicka-Barabas and Cytryńska, 2013). Thus, not only *N. ceranae* but also Proteus<sup>®</sup> seemed to have an impact on lipids with unclear consequence on metabolism, cell membrane stability and activity and immunity.

### G.4.3.9. Proteus® and N. ceranae affected synaptic and hormonal plasticity

Not only the neurotoxic Proteus<sup>®</sup> but also *N. ceranae* induced changes in the expression of genes involved in nervous system and synaptic plasticity, including cAMP-dependent protein kinase (PKA) and Meng-Po kinase and the short neuropeptide F (**Table 2**). Both stressors regulated the expression of synaptic vesicle related genes, including neurobeachin (Volders *et al.*, 2012) and clavesin-2 (Katoh *et al.*, 2009), thus affecting the storage and release of neurotransmitters in the nerve terminal. Other vesicular trafficking genes, including genes related to ER, Golgi, vacuoles or vesicle coating, were regulated too, but it was not possible to differentiate between genes related to synaptic vs other cellular trafficking in the midgut.

Such regulation of presynaptic vesicle could affect, positively or negatively, the availability of neurotransmitters and the synaptic activity.

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) and Meng-Po kinase are involved in the formation of long-term memories in the honeybee (Fiala et al., 1999; Müller, 2000; Friedrich et al., 2004; Lee et al., 2018). Meng-Po and two of the five subunits of PKA (LOC409791 and LOC410228, Eisenhardtet al., 2006) were regulated. Interestingly, thoracic injection of a proteasome inhibitor showed a link between the hereby regulated UPC and learning processes for longlasting memory (Felsenberg et al., 2012). Insecticides are known to alter honeybee learning and memory (see the review of Decourtye and Devillers, 2010; and the meta-analysis of Siviter et al., 2018). For instance, both oral and topic exposures to imidacloprid altered learning and memory, young being more sensitive (Goñalons and Farina, 2015). Concerning N. ceranae, Charbonneau et al. (2016) did not observed any significant effect of the parasite on learning and memory while Gage et al. (2018) observed age-dependent effects of the infection, with an increased memory performance of 7-days old infected nurses and a decreased learning and memory performance on 15-days old infected foragers. However, there is a missing link between those phenomena, that are associated with the brain, and the observed response of the midgut. The regulated genes in the midgut reflected the systemic response of the nervous system but their functions in the midgut may be unrelated to learning and memory.

Genes encoding neuron adhesion proteins such as Fasciclin 2 and neuroligin 3 were upregulated in NP<sub>2:20</sub> and P<sub>2:20</sub> vs Ct respectively. Interestingly, Fasciclin 2, involved in nervous system development and maintenance, and neurobeachin, involved in vesicle trafficking, are especially important in neuromuscular junctions (Volders *et al.*, 2012; Sun and Xie, 2012) and were both activated by Proteus<sup>®</sup>. The LOC410101 (trafficking kinesin-binding protein milt), involved in the transport of mitochondria in axons and germs cells, was downregulated by *N. ceranae*. However, the role of MILT in the gut may not be linked to neuronal activity. It has been suggested that the protein may be present in the gut lining since it was found in anal droplet of *Cryptorhynchus lapathi* (Jing *et al.*, 2018).

While there were no regulated genes related to the amine neurohormones previously cited, several genes related to juvenile hormone (JH) biosynthesis (**Table 2**) : LOC408559 (retinal dehydrogenase 1), LOC724216 (juvenile hormone acid O-methyltransferase), LOC410059 (citrate synthase 2), Ant (ADP/ATP translocase), according to KEGG pathway and Bomtorin *et al.*, 2014) and one to JH inactivation (LOC406152, juvenile hormone epoxide hydrolase 1) were downregulated in the midgut, especially in the NP<sub>2:20</sub> condition. Thus, local JH regulation could be linked to tissue homeostasis already discussed. At a systemic level, JH is thought to control age polyethism. The transition from nest activities to foraging is associated with changes titers of JH in hemolymph, octopamine in the brain and lipid levels (Bloch and Grozinger, 2011; Denison and Raymond-Delpech, 2008). Indeed *N. ceranae* infection accelerates age polyethism, with decreased trophallaxis and possibly higher titer of JH in

young workers while older bees walk less on combs and have higher queen mandibular pheromone attraction (Goblirsch *et al.*, 2013; Lecocq *et al.*, 2016). As a consequence, infection results in premature foraging (Goblirsch *et al.*, 2013). *N. ceranae* also impaired capacities of homing ability (returning to the hive) and impaired orientation toward the nest entrance (Kralj and Fuchs, 2010, Wolf *et al.*, 2014). In semi-field condition, oral exposure to imidacloprid and deltamethrin induced a decrease in the foraging activity (nb of visits on a flowers) and activity at the hive entrance (Decourtye *et al.*, 2004). Insecticides alter the honeybee behavior as well (Decourtye and Devillers, 2010). Oral exposure to neonicotinoids, incl. thiacloprid, affects foraging behavior and homing success, with alteration of navigation performance (speed and distance traveled) and memory, duration and frequency of resting, and continuous mobility (Fischer *et al.*, 2014; Tison *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2019). Oral exposure to thiacloprid or deltamethrin also impair social communication (Tison *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

Short neuropeptide F, (sNPF LOC100576163) in repressed in most of the pairewise comparisons. In *D. melanogaster* sNPF is mainly produced in the brain and is involved in the regulation of food intake and body size (Lee *et al.*, 2004). In contrast to Drosophila, sNPF is expressed in the honeybee midgut together with other enteroendocrine peptides (Christie, 2020). In the cockroach *Periplaneta americana* midgut, sNPF suppresses digestive activities of  $\alpha$ -amylase, protease and lipase when refeeding insects after starvation suggesting brain-midgut interplay in the regulation of digestion (Mikani *et al.*, 2012).

# G.4.4. The expression of selected genes was also regulated by Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup> by RT-QPCR

Expression of selected genes was also assessed by RT-qPCR on the same four experimental groups of the Proteus<sup>®</sup> experiment but also on the groups of the Decis<sup>®</sup> and Calypso<sup>®</sup> experiment. For instance, the overexpression of CYP6A13 (LOC112939925) and the downregulation of LOC724308 (serine protease SP53) in infected were observed. LOC413705 (acidic chitinase) downregulated in co-exposed samples was also downregulated in infected samples without intoxication by RT-qPCR. Significant modulations in RT-qPCR were observed with co-exposed samples, validating the overexpression of LOC725936 (titin homolog), LOC410175 (F-box/LRR-repeat protein 14) and LOC410562 (serine/threonine-protein kinase meng-po) and the repression of LOC713705 and LOC724308.

Decis<sup>®</sup> significantly induced the upregulation of LOC412815 (fatty acid synthase) and of three genes related to ubiquitin system: LOC410175 (F-box/LRR-repeat protein 14) and the two LOC411182 (ubiquitin-protein ligase E3A) and LOC411694 (E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1). Calypso<sup>®</sup> repressed the expression of LOC726269 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) and LOC411694 (E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1). LOC410562 (serine/threonine-protein kinase meng-po) transcript were more abundant in the DC<sub>2:20</sub>



Fig. 4. Protein content (A,B) and activities glutathione-S-transferase (GST, C,B), catalase (CAT, E,F) and alkaline phosphatase (AP, G,H) in the midgut of honeybees orally exposed to *N. ceranae* (N) at and exposed by contact to three Proteus<sup>®</sup> concentrations ( $P_{0.5:5}$ ,  $P_{1:10}$ ,  $P_{2:20}$ , left panels) or to Decis<sup>®</sup> ( $D_{2:0}$ ), Calypso<sup>®</sup> ( $C_{0:20}$ ), and to both insecticides ( $DC_{2:20}$ , right panels). Tissue activity ( $mg_T$ : mg of tissue) and specific activity ( $mg_P$ : mg of protein) are in white and hashed bars respectively. 'c', 'n' and 'i' indicate significant difference with the untreated control (Ct), with infection only (N) or with the corresponding intoxication treatment only (Mann-Whitney, p<0,05, n=6 to 9).

condition compared to control. All the previously mentioned genes were overexpressed in response to *N. ceranae*, except for LOC726269 and LOC411182 which were repressed in ND<sub>2:0</sub> and in all infected groups respectively.

## G.4.5. *N. ceranae* and Proteus<sup>®</sup> affected enzyme activities in the midgut and in the brain

Acetylcholine esterase (AChE), catalase (CAT), glutathione-S-Transferase (GST) and glutathione peroxidase (GP) activities were measured on honeybee heads and GST, alkaline phosphatase (AP) and CAT activities were measured on midguts 5 days post- intoxication. The quantification of total protein content was similar in all conditions except two in the second experiment (**Fig. 4A, B** and **Fig. 5A, B**). The protein content was significantly lower in the ND<sub>0:20</sub> midguts and in the NDC<sub>2:20</sub> heads. Such difference impacts the ratio of tissue *vs* specific activities. For these two cases we mostly considered the specific activity of enzymes.

In the first experiment the GST specific activity in the midgut (**Fig. 4C**), relative to the untreated control, significantly increased in response to  $P_{1:10}$  and to *N. ceranae*, whatever the concentration of Proteus<sup>®</sup> applied. This increase in infected midguts was also significant relative to the single insecticide treatment for the two highest doses. In the second experiment, such an increase was observed for the ND<sub>0:20</sub> and NC<sub>2:0</sub> conditions relative to the untreated, to the intoxicated-only (D<sub>0:20</sub>, C<sub>2:20</sub>) and to the infected-only midguts (N, **Fig. 4D**). The tissue GST activity seemed moderately affected by the treatments. CAT and AP specific activities were significantly affected neither by *N. ceranae* nor by insecticides, alone or in combination (**Fig. 4E-H**). Their tissue activities were more variable. AP tissue activity significantly decreased in the P<sub>1:10</sub>, NP<sub>1:10</sub>, NP<sub>2:20</sub>, ND<sub>0:20</sub> and NDC<sub>2:20</sub> treatments. The CAT tissue activity decreased in infected midguts but the NP<sub>2:20</sub> conditions in the first experiment. Its response varied a lot in the second one where infection was less successful and total protein content differed.

The link between ROS production, that participate in immune response and PCD signaling, was discussed earlier. While the only significant change in GST gene expression was a decrease in glutathione S-transferase 1-1, the GST activity increased in response to the parasite (Vidau *et al.*, 2011a; Dussaubat *et al.*, 2012). Such apparent divergence could be explained by the presence of at least 6 other GST encoding genes that could be differentially regulated however not significantly in the present data. For instance, a proteomic analysis showed a higher abundance of GST S1 in the midgut of infected honeybees (Vidau *et al.*, 2014). Moreover, the timing of changes in gene expression and its consequent in enzyme activity may be delayed, especially if there was a transient regulation immediately after Proteus<sup>®</sup> exposure. As previously mentioned, there must be an equilibrium between ROS production in response to infection and the counterbalancing antioxidant GST or CAT activities, and this equilibrium may itself be manipulated by the parasite (Paris *et al.*, 2017).



Fig. 5. Protein content (A,B) and activities glutathione-S-Transferase (GST, C,B), catalase (CAT, E,F), peroxidase (GP, G,H) and acetylcholine esterase (AChE, I,J) in the head of honeybees. Same legend as Fig.4.

The data also suggested that contact insecticide exposure may influence the activities in the midgut. The reduced AP tissue activity may also be linked to a reduced immune response to infection in the presence of Proteus<sup>®</sup> or Decis<sup>®</sup>.

As in the midgut, the GST specific activity was significantly increased in head in response to *N. ceranae* infection, but in the NP<sub>2:20</sub> condition, and to the lowest dose of Proteus <sup>®</sup> (Fig. 5C). In contrast the NDC<sub>2:20</sub> was the only condition showing an increase in activity in the second experiment (Fig. 5D). Tissue activity poorly responded to treatments. The CAT specific activity in heads decreased in the infected-only heads but returned to control levels in the combined N. ceranae and Proteus<sup>®</sup> condition (Fig. 5E). These difference between infected-only and coexposed honeybees were significant for two doses of insecticides. In contrast, the tissue activity decreased in several unrelated conditions. No significant difference was observed in the second experiment but in the NDC<sub>2:20</sub> conditions were the protein content was significantly lower (Fig. 5F). The GP specific activity in heads significantly increased in the combined NP<sub>1:10</sub> and NP<sub>2:20</sub> treatments, relative to control and to the corresponding single treatment, suggesting a synergistic effect of the stressors (Fig. 5G). The tissue activity was reduced in infected heads but then increase with the concentration of Proteus® applied on infected honeybees. In the second experiment, GP specific activity increased in all Decis® and N. ceranae-treated conditions while tissue activity was poorly affected (Fig. 5H). At last, the activity of the neural biomarker AChE did not much response in the first experiment (Fig. 5I). However, the AchE specific activity significantly increased in all the treatment comprising Decis<sup>®</sup> in the second experiment (Fig. 5J). The tissue activity was difficult to interpret with both lower and higher values compared to control. Whatsoever, the data showed that N. ceranae and insecticides can affect activities in both the midgut and the head of honeybees.

The positive and negative response to infection of GST and CAT respectively were similar in the midgut and in the head, suggesting a common response of distant organs. The data confirmed that the infection by *N. ceranae* altered not only the midgut, where it develops, but also distant organ like the brain, but also the fat body (Vidau *et al.*, 2011a), reflecting a systemic antioxidant response of the honeybee. The insecticides modulated again the response of activities, here CAT and GP, in infected honeybees. Concerning the AChE activity, its increase in response to Calypso<sup>®</sup> could be a way to compensate the post-synaptic hyper excitation induced by thiacloprid. Thiacloprid that is an agonist of nicotinic acetylcholine receptor (Casida and Durkin, 2013) and could also inhibit the AChE activity *in vitro* (Győri *et al.*, 2017). In former studies, neonicotinoids often increased AChE activity but the response seems more complex, depending on dose and mode of application. For instance, a chronic oral exposure to low dose of imidacloprid (0,08-0,24 ng.bee<sup>-1</sup>) induced an increase in AChE activity after 10 days (Boily *et al.*, 2013) while a single oral exposure to high dose (4,3 ng.bee<sup>-1</sup>) had opposite effect after 48h (Li *et al.*, 2017b).



**Fig. 6.** Mean response of the gut microbiota to *N. ceranae*, Proteus<sup>®</sup> and their combination. The mean proportion of the main bacterial groups of the microbiota were assessed in honeybees untreated (Ct), intoxicated with Proteus<sup>®</sup> (P<sub>2:20</sub>), infected by *N. ceranae* (N), or intoxicated and infected (NP<sub>2:20</sub>). Guts were sampled 16 days after infection (and 5 days after contact exposure) and analyzed trough 16S Illumina sequencing. Data represent means of 5 colony-replicates. Due to biases following infection, only significant differences between intoxicated and not intoxicated conditions (*i.e.* P<sub>2:20</sub> vs Ct, and NP<sub>2:20</sub> vs N) were shown by connecting lines (Mann-Whitney, p<0,05, n=5). <sup>1</sup> Lactobacillus kunkeei/apinorum group.



**Suppl. Fig. S7. Response of the gut microbiota to** *N. ceranae*, **Proteus**<sup>®</sup> **and their combination in each colony.** The proportion of the bacterial groups are given for each colony replicate (numbers). Ct: untreated, P<sub>2:20</sub>: exposed to Proteus<sup>®</sup>, N: infected by *N. ceranae*, NP<sub>2:20</sub> infected and exposed to Proteus. For color code, see Fig. 6.

## G.4.6. Proteus<sup>®</sup> impacted *Lactobacillus* abundance in infected honeybees only

16 days after infection (and 5 days after intoxication), the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA was sequenced on DNA extracted from hindguts of the same four experimental groups as for RNA-seq analysis (Ct, N, P<sub>2:20</sub>, NP<sub>2:20</sub>). Eleven taxonomic groups were quantified (Fig. 6). Not surprisingly, those represented the main bacterial taxa of the microbiota (Kwong & Moran, 2016). The microbiota composition varied greatly with replicates (Suppl. Fig. S7), resulting in few significant differences. In order to avoid any bias linked to the co-exposition with the bacteria contained in the spores preparation, mostly Enterobacteraceae (data not shown), only the effect of the Proteus® exposure was studied, in infected and uninfected honeybees separately. Surprisingly the Alphaproteobacteria genera Bombella (Alpha2.1), Commensalibacter (Alpha2.2) and Bartonella were very abundant (Fig. 6), representing 14 to 58% of the detected bacteria depending on the replicate. However, no significant difference was observed between honeybees exposed or not to the insecticides. In contrast, Bifidobacterium spp. were not abundant. Lactobacillus spp. were abundant and significantly decreased in response to Proteus® in infected honeybees only. The sequence data allowed the distinction of the three Lactobacillus taxa present in the honeybee gut: Lactobacillus Firm4, Lactobacillus Firm5 and the L. kunkeii / L. apinorum clade. The abundance of all of the three taxa decreased in the infected honeybees exposed to Proteus<sup>®</sup>. In uninfected honeybees the only difference was a significant decrease of F. perrara in response to Proteus<sup>®</sup>, that was not significant in infected insects.

The relative abundance of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *G. apicola* and *S. alvi* were also assessed by QPCR on the same samples, showing a very good correlation between the log of ratios (*R*=0.97, n=16) obtained by QPCR and by 16S sequencing. QPCR analyses were thus performed on the second experiment (**Suppl. Fig. S8**). Few significant effects were observed, with a decrease of *S. alvi* in response to Decis<sup>®</sup> and Calyspo<sup>®</sup> in uninfected and infected honeybees respectively. Such a decrease of *S. alvi* in response to Calypso<sup>®</sup> was not observed in response to oral exposure to neonicotinoids imidacloprid, thiamethoxam or thiacloprid (Rouzé et al, 2019; Liu *et al.*, 2020).

The whole honeybee holobiont responded to stressors. Proteus<sup>®</sup> affected the gut microbiota but only in the infected honeybees, essentially by reducing the abundance of *Lactobacillus*, whatever their clade. The oral exposure of the neonicotinoids imidacloprid, thiamethoxam and thiacloprid was shown to reduce the abundance of *Lactobacillus* in uninfected honeybees (Rouzé et al, 2019; Liu *et al.*, 2020). Here we showed that contact exposure does not have a such important effect on microbiota, but can still affect major taxa, suggesting for the first time an indirect systemic effect of neurotoxic insecticides on the gut microbiota. Such effect probably resulted from the local alterations largely discussed before, but it suggested a connection between the nervous system and the gut microbiota as thought in mammals (Rhee *et al.*, 2009). The reduction of *Lactobacillus* was only observed in infected honeybees,

suggesting an exacerbated sensitivity of the microbiota when the parasite was present, due to affection of the midgut by parasite development and/or accumulation of spores in the hindgut. In the second experiment, the abundance of *Lactobacillus* did not significantly change in response to Decis<sup>®</sup> or Calypso<sup>®</sup>. This could thus be explained by the reduced infection success of the parasite.

The microbiota contributes to host development, metabolism (through the metabolization of complex sugars into usable carbon sources), immunity (as physical barrier, through niche competition with potential pathogen, immune stimulation and production of AMPs) (Kwong *et al.*, 2017; Rayman and Moran, 2018). For instance, some *Lactobacillus* and strains have antimicrobial properties and inhibit the growth of the pathogenic *Paenibacillus larvae* or *Melissococcus plutonius* (Forsgren *et al.*, 2010; Vasquez *et al.*, 2012). Several bacterial strains, mostly isolated from contaminated soils, are also able to degrade insecticides. Among insect gut symbionts, a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from *Drosphila* showed capacities to metabolize chlorpyrifos (Daisley *et al.*, 2018). A higher *Lactobacillus* abundance was also observed in chlorpyrifos and fipronil resistant lines of the moth *Plutella xylostella* (Xia *et al.*, 2012). A decrease of *Lactobacillus* could thus reflect both a less efficient resistance to insecticide (through degradation or physical barrier) and higher susceptibility to pathogens that would participate in higher mortality when stressors are combined.

### **G.5.** Conclusion

Transcriptome data showed that both Proteus<sup>®</sup> and *N. ceranae* affect general functions and their association increased these responses, especially concerning UPS and oxidative phosphorylation. Proteus<sup>®</sup> specifically altered the expression of genes involved in muscle and cytoskeleton and *N. ceranae* genes involved in metabolism. All the affected pathways were interconnected. For instance, ROS, UPS and JH are connected to apoptosis, ROS, tissue maintenance and lipid metabolism are also linked to immunity, *etc.* The data illustrated a complex pleiotropic response of the honeybee. As there we analyzed surviving honeybee, this could reflect both a general stress response as well as an ability of the honeybee to cope and may be to recover from stress, especially concerning the unique contact application of insecticides.

Indeed, we looked at honeybee at one single time-point, 5 days after Proteus<sup>®</sup> exposure. Some responses, such as the global downregulation of antioxidant and CYP genes and of oxidative phosphorylation, were surprising compared to published data. We suggested that it could be related to a time-dependent response of the honeybee, with a transient increase following the one-shot Proteus<sup>®</sup> exposure followed by a decrease after few days in the surviving honeybees. Such transient response of genes was observed earlier (de Smet *et al.*, 2017; Tesovnik *et al.* (2020). For instance, Tesovnik *et al.* (2020) observed the inversion of the

regulation of genes IAP-2, Catalase, pKA-R1 and CYP306A1 in honeybees co-exposed to *N. ceranae* and thiamethoxam after 1 and 15 days. Consequences of infection also vary with age. Young infected nurses significantly outperformed controls in odor learning and memory while infected foragers showed deficits in learning and memory (Gage *et al.*, 2018). Such time-dependent response was complicated with the tested stress applications. The single Proteus<sup>®</sup> exposure could have led to a transient response, as seen through mortality after 24h, later rebalanced. The gut microbiome may also recover from the dysbiosis following oral thiacloprid exposure (Liu *et al.*, 2020). However, in parallel, *N. ceranae* kept proliferating and inducing a long-lasting stress. Our results showed that their combination was still effective after 5 days. So, honeybee only partly, if ever, recovered from insecticide exposure.

The local effect observed on the midgut by Proteus<sup>®</sup> could be due to two not exclusive pathways. First, the *a.i.* deposited on the honeybee surface need to diffuse to reach the brain where they mostly act. Such diffusion of diluted concentrations of neurotoxic could logically reach the midgut and affect its functions. Another way could be linked to the signaling *via* nervous and hormonal systems initially affected in the brain. Thus, we may have observed only a local portion of a systemic response to the insecticides. The same applied to *N. ceranae*. We observed local alterations due to the parasite development in the gut but the response of some hormonal and nervous system elements suggest that the parasite induce a systemic response of the honeybee, as shown by the effect of the parasite, weak but significant, on distant brain enzymatic activities. This explains the effect of the parasite on behavior. Thus, both insecticides and parasite induced local and systemic responses that were stronger when combined.



**Suppl. Fig. S1. Cumulative proportion of surviving** of honeybees orally exposed to *N. ceranae* (N) at day 0 and exposed by spraying at day 11 **A)** to three Proteus<sup>®</sup> concentrations ( $P_{0.5:5}$ ,  $P_{1:10}$ ,  $P_{2:20}$ ) or **B)** to Decis<sup>®</sup> ( $D_{2:0}$ ), Calypso<sup>®</sup> ( $C_{0:20}$ ), and to both insecticides ( $DC_{2:20}$ ). Data are based on 7 to 9 replicates of cohortes of 65 to 77 workers. Survival was assessed using the Kaplan-Meier estimator.



Suppl. Fig. S2. Principal Component Analyses (PCA) using the 10 975 expressed transcripts in the midgut (A,B) or the subset of the 1,098 differentially expressed transcripts (C,D). The percentages give the proportion of variance explained by the corresponding component. Left and right panels show the samples repartition towards the two or the three first components respectively.



**Suppl. Fig. S3. Unweighted pair-group average (UPGMA, A) and Neighbor joining (NJ, B) hierarchical analyses of the 1098 differentially expressed transcripts**, using Euclidean similarity matrix, with 100,000 resampling bootstrap replicates and without imposed rooting (the tree is by default rooted on the last branch added during tree construction).

**Suppl. Table S3. Non-parametric multivariate analyses** (NPMANOVA) performed with 1,000,000 permutations, using all the transcripts that were considered as expressed in the midgut or using only the differentially expressed transcripts. Stars indicate p<0,05.

	Expresse	d	Differentia	ally expressed
	(n=10,975	5)	(n=1,098)	
One-way NPMANOVA	F=5.978	p=0.00004*	F=6.723	p=0.0004*
P <sub>2:20</sub> vs Ct		<i>p</i> =0.3438		<i>p</i> =0.1426
N vs Ct		<i>p</i> =0.0284*		<i>p</i> =0.0284*
NP <sub>2:20</sub> vs Ct		<i>p</i> =0.0285*		<i>p</i> =0.0285*
NP <sub>2:20</sub> vs N		<i>p</i> =0.0285*		<i>p</i> =0.1427
NP <sub>2:20</sub> vs P <sub>2:20</sub>		<i>p</i> =0.0574		<i>p</i> =0.0286*
Two-way NPMANOVA				
Insecticide effect	F=4.303	<i>p</i> =0.0047*	F=1.299	<i>p</i> =0.1913
Parasite effect	F=5.729	<i>p</i> =0.0005*	F=12.392	p=0.0001*
Interaction	F=0.713	<i>p</i> =0.0181*	F=-0.985	<i>p</i> =0.1809



Suppl. Fig. S4. Repartition of transcripts modulated by *N. ceranae* (A) or Proteus<sup>®</sup> (B) in the presence and absence of the other one. The Venn diagrams allow the distinction between transcripts modulated by one stressor with and without the second one. As an example, transcripts activated by *N. ceranae* in the absence of Proteus<sup>®</sup> have significant (q<0,05) and positive log<sub>2</sub>(ratio) between the conditions N and Ct while transcript repressed by *N. ceranae* in the presence of Proteus<sup>®</sup> have significant and negative log<sub>2</sub>(ratio) between the conditions NP<sub>2:20</sub> and P<sub>2:20</sub>, and there was only one transcript showing both characters. Activated and repressed transcript counts appear in red and blue respectively. Cross sections indicate transcripts responding in the same direction (concordance: same sign of log<sub>2</sub>(ratio)) or in opposite direction.



**Suppl. Fig. S5. Repartition of transcripts modulated by** *N. ceranae* and by Proteus<sup>®</sup>, whatever the presence or absence of the other one. A. The Venn diagrams show the repartition of transcripts regulated by *N. ceranae* (whatever the insecticide exposure) and by Proteus<sup>®</sup> (whatever the infection status). As an example, transcripts activated by *N. ceranae* have significant (*q*<0,05) and positive log<sub>2</sub>(ratio) between the conditions N and Ct and/or NP<sub>2:20</sub> and P<sub>2:20</sub> while transcript repressed by Proteus<sup>®</sup> have significant and negative log<sub>2</sub>(ratio) between the conditions P<sub>2:20</sub> and Ct and/or NP<sub>2:20</sub> and N, and 20 transcripts showed both characters. Activated and repressed transcript counts appear in red and blue respectively. Cross sections indicate transcripts responding in the same direction (concordance: same sign of log<sub>2</sub>(ratio)) or in opposite direction. **B.** Same figure as in A but with the transcripts significantly activated (purple) or repressed (green) in the NP<sub>2:20</sub> condition compared to Ct. 58% of them are not significant in the other comparisons (in the center of the figure).

Α.



**Suppl. Fig. S6. Mean expression level of transcripts.** The mean of FPKM was computed for each sample (n transcripts) then the mean and  $IC_{95}$  were calculated for each conditions (n=3 or 4 replicates). Condition (C=Ct: control, P=P<sub>2:20</sub>: Proteus<sup>®</sup>, N: *N. ceranae*, NP=NP<sub>2:20</sub>: *N. ceranae* + Proteus<sup>®</sup>) and mean values are given at the base of the bars. As values varied greatly with the subsets of transcripts, they were transformed to ratio of expression relative to the untreated control (brought to 1).

- Considering all 28,328 transcripts, the mean expression level was low and decreased with stressors but not significantly. Cuffdiff is supposed to have normalized the data so it is not supposed to be an artefact.
- The 8,252 expressed transcripts (*i.e.* with at least one mean FKPM is >3 in one of the four conditions) showed again a not significant decreased of expression with stressors. The PCA bases on these data differentiated the N and NP samples (Suppl. Fig. S2A,B).
- Transcripts with a mean FKPM<3 in all four conditions were considered as not expressed. There was no change in mean expression, thus the difference observed earlier was due to expressed genes.
- Differentially expressed transcripts (q<0.05) showed significant changes in mean expression levels. Identical letter above bars indicate the absence of significant difference (Mann-Whitney, n=3 or 4). Two-way NPMANOVA indicated significant effect of Proteus<sup>®</sup> (p=0,0413) and *N. ceranae* (p=0,0007) but no interaction between stressors (p=0,1367). Here the PCA grouped the N and NP samples together (Suppl. Fig. S2C,D).
- The 7,154 not-differentially expressed transcripts did not show any change in mean expression level, thus the difference observed earlier was due to differentially expressed genes.

The results suggested that they could be a global attenuation of expression in response to stressors that is exacerbated in the combined treatment. This is visible when comparing the proportion of repressed transcripts:

	Comparison	% repressed transcripts (n regulated)
Regulated by N	N vs Ct	50 % (n=371)
	NP <sub>2:20</sub> vs P <sub>2:20</sub>	72 % (n=229)
Regulated by P <sub>2:20</sub>	P <sub>2:20</sub> vs Ct	43 % (n=265)
	NP <sub>2:20</sub> vs N	77 % (n=246)
Regulated by NP <sub>2:20</sub>	NP <sub>2:20</sub> vs Ct	78 % (n=732)



Suppl. Fig. S8. Proportion of four of the major bacterial groups of the core gut microbiota of honeybees infected by *N. ceranae* (N) and/or exposed to Decis<sup>®</sup> (D<sub>2:0</sub>), Calypso<sup>®</sup> (C<sub>0:20</sub>) or both formulations (DC<sub>2:20</sub>). Guts were sampled 16 days after infection (and 5 days after intoxication) and analyzed by QPCR. Stars indicate significant difference with the untreated control (Mann-Whitney, p<0,05, n=6). Due to biases following infection, only significant differences between intoxicated and not intoxicated conditions (*i.e.* Ct or N) were considered.

### **G.6.** Acknowledgements and references

### Acknowledgements :

The project was funded by the ANR MIXTRESS program (ANR-15-CE34-0004) and the CNRS EC2CO CALAMITI project. The authors are thankful to Chafika Sidi (UCA Master student), Marie Diogon (UCA), Nicolas Cazanove, Angélique Dupuy, Abalhassani Saïd and Bernard Xavier (GDS Réunion) for their help in the molecular and infection experiments. The authors declare no conflict of interest.

#### **References** :

- Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltemann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A, Blankenberg D (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* **46**:W537-W544.
- Agarwal M, Giannoni Guzmán M, Morales-Matos C, Del Valle Díaz RA, Abramson CI, Giray T (2011) Dopamine and octopamine influence avoidance learning of honey bees in a place preference assay. PLoS One. 6(9):e25371.
- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol.* **12**(3):774-82.
- Aljedani DM (2017) Effects of abamectin and deltamethrin to the foragers honeybee workers of *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. *Saudi J Biol Sci.* **24:**1007-1015.
- Aljedani DM, Almehmadi RM (2016). Effects of some insecticides on longevity of the foragers honey bee worker of local honey bee race *Apis mellifera jemenatica*. *Electronic Physician*. **8**:1843–1849.
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol*. **11**:2284-90.
- Annoscia D, Brown SP, Di Prisco G, De Paoli E, Del Fabbro S, Frizzera D, Zanni V, Galbraith DA, Caprio E, Grozinger CM, Pennacchio F, Nazzi F (2019) Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proc. R. Soc. B.* **286**:20190331.
- Arrese EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu Rev Entomol. 55: 207-25.
- Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep.* **2**: 326.
- Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N (2014) Transcriptome analyses of the honeybee response to Nosema ceranae and insecticides. *PLoS One*. **9**:e91686.
- Badaoui B, Fougeroux A, Petit F, Anselmo A, Gorni C, Cucurachi M, Cersini A, Granato A, Cardeti G, Formato G, Mutinelli F, Giuffra E, Williams JL, Botti S (2017) RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS One*. **12**:0173438.
- Bakowski MA, Desjardins CA, Smelkinson MG, Dunbar TL, Lopez-Moyado IF, Rifkin SA, Cuomo CA, Troemel ER (2014) Ubiquitin-mediated response to microsporidia and virus infection in *C. elegans. PLoS Pathog.* **10**:e1004200.
- Balla KM, Lažetić V, Troemel ER (2019) Natural variation in the roles of *C. elegans* autophagy components during microsporidia infection. *PLoS One*. **14**:e0216011.
- Barletta AB, Alves LR, Silva MC, Sim S, Dimopoulos G, Liechocki S, Maya-Monteiro CM, Sorgine MH (2016) Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus. *Sci Rep.* **18(**6):19928.
- Behnam-Oskuyee S., M. Ziaee and P. Shishehbor (2020) Evaluation of different insecticides for the control of sugarcane whitefly, *Neomaskellia andropogonis* Corbett (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. **19**(4):255-260.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*. **43**:348–370.
- Berenbaum MR, Johnson RM (2015 Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Science*. **10**:51-8.
- Blatt J, Roces F (2201) 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**(Pt 15):2709-16.
- Bloch G, Grozinger CM (2011) Social molecular pathways and the evolution of bee societies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **366**(1574):2155-70.
- Boily M, Sarrasin B, Deblois C, Aras P, Chagnon M (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environ Sci Pollut Res Int.* **20**(8):5603-14.

- Bomtorin AD, Mackert A, Rosa GC, Moda LM, Martins JR, Bitondi MM, Hartfelder K, Simões ZL (2014) Juvenile hormone biosynthesis gene expression in the corpora allata of honey bee (*Apis mellifera* L.) female castes. *PLoS One*. **9**(1):e86923.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M (2013) *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet. Res.* 44:25.
- Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Büchler R (2016) The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). J Insect Physiol. **86**:40-7.
- Broderick NA, Welchman DP, Lemaitre B (2009) Recognition and response to microbial infection in *Drosophila*. In *Insect infection and immunity: evolution, ecology, and mechanisms*; Rolff J, Reynolds S (Eds). Oxford University Press: New York, USA. pp. 13-33.
- Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, Brunet J-L, Badiou-Beneteau A (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a casestudy of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem.* **32**:2117–24.
- Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol.* 58:99-117.
- Chaimanee V, Chen Y, Pettis JS, Cornman RS, Chantawannakul P (2011) Phylogenetic analysis of Nosema ceranae isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. J. Invertebr Pathol. 107:229–233.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae. J. Insect Physiol.* **58**:1090–1095.
- Charbonneau LR, Hillier NK, Rogers RE, Williams GR, Shutler D (2016) Effects of Nosema apis, N. ceranae, and coinfections on honey bee (Apis mellifera) learning and memory. Sci Rep. **10(**6):22626.
- Charreton M, Decourtye A, Henry M, Rodet G, Sandoz JC, Charnet P, Collet C (2015) A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PLoS One*. **10**(12):e0144879.
- Chen D, Huang X, Liu L, Shi N (2007). Deltamethrin induces mitochondrial membrane permeability and altered expression of cytochrome C in rat brain. *J Appl Toxicol*. **27**(4):368-72.
- Chen YS, Qiu XB (2013) Ubiquitin at the crossroad of cell death and survival. Chin J Cancer. 32(12):640-7.
- Chotiwan N, Andre BG, Sanchez-Vargas I, Islam MN, Grabowski JM, Hopf-Jannasch A, Gough E, Nakayasu E, Blair CD, Belisle JT, Hill CA, Kuhn RJ, Perera R (2018) Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog.* **14**(2):e1006853.
- Christen V, Krebs J, Fent K (2019) Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. *J Hazard Mater*. **377**:215-226.
- Christie AE (2020) Assessment of midgut enteroendocrine peptide complement in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*. **116**:103257.
- Clark KA, Bland JM, Beckerle MC (2007) The Drosophila muscle LIM protein, Mlp84B, cooperates with D-titin to maintain muscle structural integrity. J Cell Sci. **120**(12):2066-77.
- Colin ME, Belzunces LP (1992) Evidence of synergy between prochloraz and deltametrin in *Apis mellifera* L.: A convenient biological approach. *Pestic. Sci.* **36**:115–119.
- Collison E, Hird H, Cresswell J, Tyler C (2016) Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health a critical analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **91**(4):1006-1019.
- Costa V, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P (2007) Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*. **59**(4-5):293-8.
- Daisley BA, Trinder M, McDowell TW, Collins SL, Sumarah MW, Reid G (2018) Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent interactions with *Lactobacilli* in a *Drosophila melanogaster* insect model. *Appl Environ Microbiol.* **84**(9).
- De Smet L, Hatjina F, Ioannidis P, Hamamtzoglou A, Schoonvaere K, Francis F, Meeus I, Smagghe G, de Graaf DC (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**(2):e0171529.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue MH (2004) Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf.* **57**(3):410-9.
- Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. Adv Exp Med Biol. 683:85-95.
- Denison R, Raymond-Delpech V (2008) Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert Neurosci*. **8**(1):1-9.
- Derecka K, Blythe MJ, Malla S, Genereux DP, Guffanti A, Pavan P, Moles A, Snart C, Ryder T, Ortori CA, Barrett DA, Schuster E, Stöger R (2013) Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. *PLoS One*. **8**(7):e68191.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J-L, Alaux C (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*. **8**:e72016.
- Ding YR, Yan ZT, Si FL, Li XD, Mao QM, Asghar S, Chen B (202° Mitochondrial genes associated with pyrethroid resistance revealed by mitochondrial genome and transcriptome analyses in the malaria vector *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* **76**(2):769-778.

- Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RF, Paxton RJ (2015) Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ Microbiol.* **17**(4):969-83.
- Douglas A (2012) Alimentary canal, digestion and absorption. In R. Chapman, *The insects: structure and function*, 5<sup>th</sup> ed.; R., Simpson, S., Douglas, A., Eds; Cambridge University Press, New York, USA. pp. 46-80.
- Douglas MR, Sponsler DB, Lonsdorf EV, Grozinger CM (2020) County-level analysis reveals a rapidly shifting landscape of insecticide hazard to honey bees (*Apis mellifera*) on US farmland. *Sci Rep* **10**:797.
- Durairaj G, Kaiser P (2014) The 26S proteasome and initiation of gene transcription. Biomolecules. 4(3):827-47.
- Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RF, Le Conte Y, Alaux C (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One*. **7**(5):e37017.
- Eisenhardt D, Kühn C, Leboulle G (2006) The PKA-CREB system encoded by the honeybee genome. *Insect Mol Biol.* **15**(5):551-61.
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G (2018) FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*. **34**:1287-1294.
- Fadda M, Hasakiogullari I, Temmerman L, Beets I, Zels S, Schoofs L (2019) Regulation of feeding and metabolism by Neuropeptide F and Short Neuropeptide F in invertebrates. *Front Endocrinol* (Lausanne). **10**:64.
- Farooqui T, Vaessin H, Smith BH (2004) Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *J Insect Physiol*. **50**(8):701-13.
- Felsenberg J, Dombrowski V, Eisenhardt D (2012) A role of protein degradation in memory consolidation after initial learning and extinction learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Learn Mem.* **19**(10):470-7.
- Feyereisen R (2006) Evolution of insect P450. Biochem Soc Trans. 34(6):1252-5.
- Fiala A, Müller U, Menzel R (1999) Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. J Neurosci. **19**(22):10125-34.
- Fischer J, Müller T, Spatz AK, Greggers U, Grünewald B, Menzel R (2014) Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One*. **9**(3):e91364.
- Fontbonne R, Garnery L, Vidau C, Aufauvre J, Texier C, Tchamitchian S, El Alaoui H, Brunet JL, Delbac F, Biron DG (2013) Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect Genet Evol*. **17**:188-94.
- Forsgren E, Fries I (2010) Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees. Vet Parasitol. **170**(3-4):212-7.
- Forsgren E, Olofsson TC, Váasquez A, Fries I (2010) Novel lactic acid bacteria inhibiting Paenibacillus larvae in honey bee larvae. *Apidologie* **41**:99–108
- Franchet A, Niehus S, Caravello G, Ferrandon D (2019) Phosphatidic acid as a limiting host metabolite for the proliferation of the microsporidium *Tubulinosema ratisbonensis* in *Drosophila* flies. *Nat Microbiol.* **4**(4):645-655.
- Franzen C (2005) How do microsporidia invade cells? *Folia Parasit*. **52:**36–40.
- French AS, Simcock KL, Rolke D, Gartside SE, Blenau W, Wright GA (2014) The role of serotonin in feeding and gut contractions in the honeybee. *J Insect Physiol.* **61**:8-15.
- Friedrich A, Thomas U, Müller U (2004) Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci.* **24**(18):4460-8.
- Gage SL, Kramer C, Calle S, Carroll M, Heien M, DeGrandi-Hoffman G (2018) *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). J Exp Biol. 221(4).
- Gaire S, Scharf M, Gondhalekar A (2020) Synergistic toxicity interactions between plant essential oil components against the common bed bug (*Cimex lectularius* L.). *Insects*. **11**:133.
- Genersch E (2010) Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:87–97.
- Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colonylevel traits in bees. *Nature*. **491**(7422):105-8.
- Glavan G, Božič J (2013) The synergy of xenobiotics in honey bee *Apis mellifera*: mechanisms and effects. *Acta Biologica Slovenica*. **56:**11–25.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82(2):373-428.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M (2013) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One*. **8**(3):e58165.
- Goblirsch M (2018) Nosema ceranae disease of the honey bee (Apis mellifera). Apidologie. 49:131–150.
- Gong Y, Diao Q (2017) Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*. **26**(1):1-12.
- Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*. **347**:1255957.
- Gregorc A, Bowen ID (2000) Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, Amitraz and Oxytetracycline. *Cell Biol Int.* **24**(5):319-24.
- Gregorc A, Silva-Zacarin EC, Carvalho SM, Kramberger D, Teixeira EW, Malaspina O (2016) Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere*. **147**:328-36.
- Győri J, Farkas A, Stolyar O, Székács A, Mörtl M, Vehovszky Á (2017) Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biol Hung*. **68**(4):345-357.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. **4**:9pp.
- Harsh S, Heryanto C, Eleftherianos I (2019) Intestinal lipid droplets as novel mediators of host-pathogen interaction in *Drosophila*. *Biol Open*. **8**(7).
- Haslbeck V, Kaiser CJ, Richter K (2012) Hsp90 in non-mammalian metazoan model systems. *Biochim Biophys Acta*. **1823**(3):712-21.
- He X, Fu Z, Li M, Liu H, Cai S, Man N, Lu X (2015) *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in BmN cells (*Bombyx mori*). *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). **47**(9):696-702.
- He X, He X, Liu H, Li M, Cai S, Fu Z, Lu X (2014) Proteomic analysis of BmN cells (*Bombyx mori*) in response to infection with *Nosema bombycis. Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). **46**(11):982-90.
- 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(3):211-7.
- Higes M, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, García-Palencia P, Martín-Hernández R (2013) Apoptosis in the pathogenesis of Nosema ceranae (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (Apis mellifera). Environ Microbiol Rep. 5(4):530-6.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL (2009) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:110-113.
- Hu J, Jiao D, Xu Q, Ying X, Liu W, Chi Q, Ye Y, Li X, Cheng L (2016) Identification of proteasome subunit beta type 2 associated with deltamethrin detoxification in *Drosophila* Kc cells by cDNA microarray analysis and bioassay analyses. *Gene*. **582**(1):85-93.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH, Harriet J, Ramallo G, Campá J, Katz H, Gardiol G, Mendoza Y (2009) Presence of Nosema ceranae in honeybees (Apis mellifera) in Uruguay. J Invertebr Pathol. 101:150–153.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose J, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protection. **23**:371-378.
- Jacob CRO, Malaquias JB, Zanardi OZ, Silva CAS, Jacob JFO, Yamamoto PT (2019) Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*. **28**(7):744-753.
- Jing T, Wang F, Qi F, Wang Z (2018) Insect anal droplets contain diverse proteins related to gut homeostasis. *BMC Genomics*. **19**(1):784.
- Kairo G, Biron DG, Ben Abdelkader F, Bonnet, Tchamitchian S, Cousin M, Dussaubat C, Benoit B, Kretzschmar A, Belzunces LP, Brunet J-L (2017) *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Sci Rep.* **7**:8556.
- Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **47**:D590-D595.
- Kanost MR, Clem RJ (2012) Insect proteases. In *Insect molecular biology and biochemistry*; Gilbert LI (Ed). Academic Press, London, United Kigdom. pp. 346-364.
- Katoh Y, Ritter B, Gaffry T, Blondeau F, Höning S, McPherson PS (2009) The clavesin family, neuron-specific lipidand clathrin-binding Sec14 proteins regulating lysosomal morphology. J Biol Chem. 284(40):27646-54.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol. **96**:1–10.
- Kralj J, Fuchs S (2010) *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* **41**:21–28.
- Kunce W, Josefsson S, Örberg J, Johansson F (2015) Combination effects of pyrethroids and neonicotinoids on development and survival of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol Environ Saf*. **122**:426-31.
- Kuraishi T, Hori A, Kurata S (2013) Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster. Front Physiol.* **4**:375.
- Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Widder M, Moritz RF (2015) Nosema tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS One*. **10**(10):e0140174.
- Kurze C, Le Conte Y, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Moritz RFA (2018) Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *J Invertebr Pathol*. **154**:1-4.
- Kurze C, Mayack C, Hirche F, Stangl GI, Le Conte Y, Kryger P, Moritz RF (2016) *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitol Res.* **115**(6):2381-8.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA (2017) Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R Soc Open Sci.* **4**(2):170003.
- Kwong WK, Moran NA (2016). Gut microbial communities of social bees. Nat. Rev. Microbiol. 14:374–384.

- Lecocq A, Jensen AB, Kryger P, Nieh JC (2016) Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. Sci Rep. 6:22042.
- Lee KS, You KH, Choo JK, Han YM, Yu K (2004) *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *J Biol Chem.* **279**(49):50781-9.
- Lee PT, Lin G, Lin WW, Diao F, White BH, Bellen HJ (2018) A kinase-dependent feedforward loop affects CREBB stability and long term memory formation. *eLife*. **7**: e33007.
- Leiro J, Iglesias R, Paramá A, Sanmartin ML, Ubeira FM (2001) Respiratory burst responses of rat macrophages to microsporidian spores. *Exp Parasitol*. **98**(1):1-9.
- Levchenko MA, Silivanova EA (2020) Synergistic and antagonistic effects of insecticide binary mixtures against house flies (*Musca domestica*). Regulatory Mechanisms in Biosystems. **10:**75–82.
- Li Z, Li M, He J, Zhao X, Chaimanee V, Huang WF, Nie H, Zhao Y, Su S (2017) Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pestic Biochem Physiol*. **140**:1-8.
- Liu QM, Li CX, Wu Q, Shi QM, Sun AJ, Zhang HD, Guo XX, Dong YD, Xing D, Zhang YM, Han Q, Diao XP, Zhao TY (2017) Identification of differentially expressed genes in deltamethrin-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus*. J Am Mosq Control Assoc. **33**(4):324-330.
- Liu YJ, Qiao NH, Diao QY, Jing Z, Vukanti R, Dai PL, Ge Y (2020) Thiacloprid exposure perturbs the gut microbiota and reduces the survival status in honeybees. *J Hazard Mater*. **389**:121818.
- Low P (2006) The Role of Proteasome in Apoptosis. In *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases;* Srivastava R (Ed). Humana Press, Totowa, NJ, USA. pp. 273-293.
- Lüder CG, Gross U, Lopes MF (2001) Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol*. **17**(10):480-6.
- Malone LA, Gatehouse HS (1998) Effects of Nosema apis infection on honey bee (Apis mellifera) digestive proteolytic enzyme activity. J. Invertebr. Pathol. 71:169-174.
- Manjon C, Troczka BJ, Zaworra M, Beadle K, Randall E, Hertlein G, Singh KS, Zimmer CT, Homem RA, Lueke B, Reid R, Kor L, Kohler M, Benting J, Williamson MS, Davies TGE, Field LM, Bass C, Nauen R (2018) Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Curr Biol.* **28**(7):1137-1143.e5.
- Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **15**(2):81-94.
- Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Budge GE, Meana A, Boonham N (2017) Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One*. **12**(2):e0170183.
- Martins JR, Anhezini L, Dallacqua RP, Simões ZL, Bitondi MM (2011) A honey bee hexamerin, HEX 70a, is likely to play an intranuclear role in developing and mature ovarioles and testioles. *PLoS One*. **6**(12):e29006.
- Mayack C, Natsopoulou ME, McMahon DP (2015) *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Mol Biol.* **24**(6):662-70.
- Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee Apis mellifera from Nosema ceranae infection. J Invertebr Pathol. 100(3):185-8.
- McKinstry M, Chung C, Truong H, Johnston BA, Snow JW (2017) The heat shock response and humoral immune response are mutually antagonistic in honey bees. *Sci Rep.* **7**(1):8850.
- Mengoni Goñalons C, Farina WM (2015) Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One*. **10**(10):e0140814.
- Mikani A, Wang QS, Takeda M (2012) Brain-midgut short neuropeptide F mechanism that inhibits digestive activity of the American cockroach, *Periplaneta americana* upon starvation. *Peptides*. **34**(1):135-44.
- Morelli E, Ginefra P, Mastrodonato V, Beznoussenko GV, Rusten TE, Bilder D, Stenmark H, Mironov AA, Vaccari T (2014) Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy, endocytic, and exocytic trafficking during epithelial formation in *Drosophila*. *Autophagy*. **10**(12):2251-68.
- Müller U (2000) Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron*. **27**(1):159-68.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Vanengelsdorp D, Pettis JS (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*. **5**:e9754.
- Mullin CA (2015) Effects of 'inactive' ingredients on bees. Curr Opin Insect Sci. 10:194-200.
- Naggar YA, Baer B (2019) Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). Sci Rep. **9**:1–11.
- Nagy K, Duca RC, Lovas S, Creta M, Scheepers PTJ, Godderis L, Ádám B (2020) Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. *Environ Res.* **181**:108926.
- Nakjang S, Williams TA, Heinz E, Watson AK, Foster PG, Sendra KM, Heaps SE, Hirt RP, Martin Embley T (2013) Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome Biol Evol.* **5**(12):2285-303.
- Nelson DR (2009) The cytochrome p450 homepage. Hum. Genomics. 4:59-65.
- Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HC, Guelfi M, Balieira KV, De Jong D, Mingatto FE (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ Toxicol Chem.* **33**(9):2070-5.

- Nikolenko AG, Saltykova ES, Gaifullina LR (2012) Molecular mechanisms of antioxidant protective processes in honeybee *Apis mellifera*. In *Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: molecular aspects of cell signaling;* Farooqui T, Farooqui AA (Eds). Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA. pp. 279-293.
- O'Neal ST, Anderson TD, Wu-Smart JY (2018) Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* **26**:57-62.
- Paldi N, Glick E, Oliva M, Zilberberg Y, Aubin L, Pettis J, Chen Y, Evans JD (2010) Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Appl Environ Microbiol*. **76**(17):5960-4.
- Pan G, Xu J, Li T, Xia Q, Liu SL, Zhang G, Li S, Li C, Liu H, Yang L, Liu T, Zhang X, Wu Z, Fan W, Dang X, Xiang H, Tao M, Li Y, Hu J, Li Z, Lin L, Luo J, Geng L, Wang L, Long M, Wan Y, He N, Zhang Z, Lu C, Keeling PJ, Wang J, Xiang Z, Zhou Z (2013) Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics*. 14:186.
- Panek J, Paris L, Roriz D, Mone A, Dubuffet A, Delbac F, Diogon M, El Alaoui H (2018) Impact of the microsporidian Nosema ceranae on the gut epithelium renewal of the honeybee, Apis mellifera. J Invertebr Pathol. **159**:121-128.
- Paris L, Roussel M, Pereira B, Delbac F, Diogon M (2017) Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. *Microb Biotechnol.* **10**(6):1702-1717.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*. **99:**153–158.
- Piva R, Belardo G, Santoro MG (2006) NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid Redox Signal.* **8**(3-4):478-86.
- Plenchette S, Filomenko R, Logette E, Solier S, Buron N, Cathelin S, Solary E (2004) Analyzing markers of apoptosis in vitro. Methods Mol Biol. 281:313-31.
- Poquet Y, Bodin L, Tchamitchian M, Fusellier M, Giroud B, Lafay F, Buleté A, Tchamitchian S, Cousin M, Pélissier M, Brunet JL, Belzunces LP (2014) A pragmatic approach to assess the exposure of the honey bee (*Apis mellifera*) when subjected to pesticide spray. *PLoS One*. **9**:e113728.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* **25:**345–353.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**:D590-D596.
- Rahman MM, Franch-Marro X, Maestro JL, Martin D, Casali A (2017 Local Juvenile Hormone activity regulates gut homeostasis and tumor growth in adult *Drosophila*. Sci Rep. **7**(1):11677.
- Rand EED, Smit S, Beukes M, Apostolides Z, Pirk CWW, Nicolson SW (2015) Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci Rep.* **5**:11779.
- Rangel J, Gonzalez A, Stoner M, Hatter A, Traver BE (2018) Genetic diversity and prevalence of *Varroa destructor*, *Nosema apis*, and *N. ceranae* in managed honey bee (*Apis mellifera*) colonies in the Caribbean island of Dominica, West Indies. *J Apic Res.* **57**:541–550.
- Raymann K, Moran NA (2018) The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Curr Opin Insect Sci.* **26**:97-104.
- Reddy KC, Dror T, Sowa JN, Panek J, Chen K, Lim ES, Wang D, Troemel ER (2017) An intracellular pathogen response pathway promotes proteostasis in *C. elegans. Curr Biol.* **27**(22):3544-3553.e5.
- Retschnig G, Neumann P, Williams GR (2014) Thiacloprid–*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *J Invertebr Pathol*. **118**:18–19.
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA (2009) Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **6**(5):306-14.
- Rost-Roszkowska MM, Poprawa I, Kaczmarek Ł (2013) Autophagy as the cell survival in response to a microsporidian infection of the midgut epithelium of *Isohypsibius granulifer granulifer* (Eutardigrada: Hypsibiidae). Acta Zoologica. **94:**273-279.
- Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N (2019) The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ*. **34**:226-233.
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide Residues and Bees A Risk Assessment. PLoS ONE. 9:e94482.
- Schott M, Bischoff G, Eichner G, Vilcinskas A, Büchler R, Meixner MD, Brandt A (2017) Temporal dynamics of whole body residues of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in live or dead honeybees. *Sci Rep.* **7**(1):6288.
- Schwarz RS, Evans JD (2013) Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev Comp Immunol.* **40**:300–310.
- Şekeroğlu V, Şekeroğlu ZA, Kefelioğlu H (2013) Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environ Toxicol.* **28**(9):524-31.
- Shah S, Yarrow C, Dunning R, Cheek B, Vass S, Windass J, Hadfield S (2012) Insecticide detoxification indicator strains as tools for enhancing chemical discovery screens. *Pest Manag Sci.* **68**(1):38-48.
- Shi TF, Wang YF, Liu F, Qi L, Yu LS (2017). Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol.* **110**(6):2283-2289.
- Shi XZ, Zhong X, Yu XQ (2012) *Drosophila melanogaster* NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochem Mol Biol.* **42**(8):545-56.

- Sinpoo C, Paxton RJ, Disayathanoowat T, Krongdang S, Chantawannakul P (2017) Impact of Nosema ceranae and Nosema apis on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. J Insect Physiol. **105**:1–8.
- Siviter H, Koricheva J, Brown MJF, Leadbeater E (2018) Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. J Appl Ecol. 55(6):2812-2821.
- Sponsler DB, Johnson RM (2017) Mechanistic modeling of pesticide exposure: The missing keystone of honey bee toxicology. *Environ Toxicol Chem.* **36**(4):871-881.
- Straub L, Williams GR, Pettis J, Fries I, Neumann P (2015) Superorganism resilience: eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Curr. Opin. Insect Science*. **12**:109-112.
- Suchail S, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces LP (2004a) In vivo distribution and metabolisation of 14Cimidacloprid in different compartments of Apis mellifera L. Pest Manag Sci. 60(11):1056-62.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP (2004b) Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag Sci*. **60**(3):291-6.
- Sun M, Xie W (2012) Cell adhesion molecules in *Drosophila* synapse development and function. *Sci China Life Sci.* **55**(1):20-6.
- Tesovnik T, Zorc M, Ristanić M, Glavinić U, Stevanović J, Narat M, Stanimirović Z (2020) Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. *Environ Pollut*. **256**:113443.
- Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S (2014) Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie*. **45**:545–553.
- Tison L, Hahn ML, Holtz S, Rößner A, Greggers U, Bischoff G, Menzel R (2016) Honey bees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ Sci Technol.* **50**(13):7218-27.
- Toplak I, Jamnikar Ciglenečki U, Aronstein K, Gregorc A (2013) Chronic Bee Paralysis Virus and Nosema ceranae experimental co-infection of winter honey bee workers (*Apis mellifera* L.). Viruses. **5**:2282–2297.
- Tosi S, Burgio G, Nieh JC (2017a) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Sci Rep.* **7**(1):1201.
- Tosi S, Nieh JC, Sgolastra F, Cabbri R, Medrzycki P (2017b) Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. *Proc Biol Sci.* **284**(1869).
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* **28:**511-515.
- Traynor KS, Pettis JS, Tarpy DR, Mullin CA, Frazier JL, Frazier M, vanEngelsdorp D (2016) In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Sci Rep.* **6**:33207.
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson TC (2017) Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS One*. **7**(3):e33188.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, El Alaoui H, Belzunces LP, Delbac F (2011a) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*. **66**:e21550.
- Vidau C, González-Polo RA, Niso-Santano M, Gómez-Sánchez R, Bravo-San Pedro JM, Pizarro-Estrella E, Blasco R, Brunet JL, Belzunces LP, Fuentes JM (2011b) Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology*. **32**(6):935-43.
- Vidau C, Panek J, Texier C, Biron DG, Belzunces LP, Le Gall M, Broussard C, Delbac F, El Alaoui H (2014) Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol*. **121**:89-96.
- Villa JD, Bourgeois AL, Danka RG (2013) Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie*. **44**:511–518.
- Vleugels R, Verlinden H, Vanden Broeck J (2015) Serotonin, serotonin receptors and their actions in insects. *Neurotransmitter* **2**:e314.
- Volders K, Scholz S, Slabbaert JR, Nagel AC, Verstreken P, Creemers JW, Callaerts P, Schwärzel M(2012) *Drosophila* rugose is a functional homolog of mammalian Neurobeachin and affects synaptic architecture, brain morphology, and associative learning. *J Neurosci.* **32**(43):15193-204.
- Wadi L, Reinke AW (2020) Evolution of microsporidia: An extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog.* **16**:e1008276.
- Walderdorff L, Laval-Gilly P, Bonnefoy A, Falla-Angel J (2018) Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (lippopolysacharide) of *Escherichia coli. J Insect Physiol.* **108**:17-24.
- Wang Y, Dang X, Luo B, Li C, Long M, Li T, Li Z, Pan G, Zhou Z (2015) Characterization of a novel otubain-like protease with deubiquitination activity from *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Parasitol Res.* **114**(10):3759-66.
- Wilkins RM (2017) Insecticide resistance and intracellular proteases. *Pest Manag Sci.* **73**(12):2403-2412.
- Wolf S, McMahon DP, Lim KS, Pull CD, Clark SJ, Paxton RJ, Osborne JL (2014) So near and yet so far: harmonic radar reveals reduced homing ability of *Nosema* infected honeybees. *PLoS One*. **9**(8):e103989.

- Wraight SP (2003) Synergism between insect pathogens and entomophagous insects, and its potential to enhance biological control efficacy. In *Predators and parasitoids*; Opender K, Dhaliwal GS (Eds). Taylor & Francis: New York, USA. pp. 142-144.
- Wright GA (2011) The role of dopamine and serotonin in conditioned food aversion learning in the honeybee. *Commun Integr Biol.* **4**(3):318-20.
- Wu J, Yu X, Wang X, Tang L, Ali S (2019) Marine enhances the pathogenicity of *Beauveria brongniartii* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Front. Microbiol.* **10:**1812.
- Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W, You M (2013) DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS One*. 8(7):e68852.
- Xiong C, Fang F, Chen L, Yang Q, He J, Zhou D, Shen B, Ma L, Sun Y, Zhang D, Zhu C (2014) Trypsin-catalyzed deltamethrin degradation. *PLoS One*. **9**(3):e89517.
- Yamada T, Habara O, Kubo H, Nishimura T (2018) Fat body glycogen serves as a metabolic safeguard for the maintenance of sugar levels in *Drosophila*. *Development*. **145**(6).
- Yang Q, Zhou D, Sun L, Zhang D, Qian J, Xiong C, Sun Y, Ma L, Zhu C (2008) Expression and characterization of two pesticide resistance-associated serine protease genes (NYD-tr and NYD-ch) from *Culex pipiens pallens* for metabolism of deltamethrin. *Parasitol Res.* **103**(3):507-16.
- Yao J, Zhu YC, Adamczyk J (2018) Responses of honey bees to lethal and sublethal doses of formulated clothianidin alone and mixtures. *J Econ Entomol.* **111**:1517–1525.
- Zdbicka-Barabas A, Cytrynska M (2013) Apolipophorins and insects immune response. *Invertebr. Surviv. J.* **10:**58-68.
- Zhang G, Zhang W (2019) Protein-protein interaction network analysis of insecticide resistance molecular mechanism in *Drosophila melanogaster*. Arch Insect Biochem Physiol. **100**(1):e21523.
- Zhang ZY, Li Z, Huang Q, Zhang XW, Ke L, Yan WY, Zhang LZ, Zeng ZJ (2020) Deltamethrin impairs honeybees (*Apis mellifera*) dancing communication. Arch Environ Contam Toxicol. **78**(1):117-123.
- Zheng H-Q, Gong H-R, Huang S-K, Sohr A, Hu F-L, Chen YP (2015) Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Veterinary Microbiology* **177**:1–6.
- Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD, Jiang H (2006) Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol.* **15**(5):603-14.



**Suppl Fig. S9. Mortalité d'abeilles suite à une exposition aigüe de contact au Proteus**<sup>®</sup>. Des cohortes d'abeilles (n=30) ont été exposées par spray à cinq doses de formulation. La mortalité a été suivie à partir du jour suivant.

# G.7. Résultats non publiés

# G.7.1. Exposition préliminaire par contact à différentes doses de Proteus®

Des expérimentations préliminaires avaient été effectuées pour choisir les doses de Proteus<sup>®</sup> à appliquer par la suite. Pour cela des abeilles ont été exposées par contact, comme décrit dans la publication, à des doses croissantes de Proteus<sup>®</sup> et leur mortalité a été suivie sur 14 jours (**Suppl Fig. S9**). Des mortalités supérieures à 90% ont été observées dès le jour suivant une exposition à des doses pourtant recommandées (0,4 et 0,5 L.ha<sup>-1</sup>). Le choix s'est alors porté sur les doses induisant des mortalités moindres (0,05 ; 0,1 et 0,2 L.ha<sup>-1</sup>), bien qu'il n'y ait pas eu de grande différence entre les deux doses inférieures sur les 11 premiers jours.

# G.7.2. Effet d'une infection naturelle sur une expostion topique aux insecticides

Des expérimentations ont été réalisées afin d'étudier l'effet d'une infection naturelle par *N. ceranae* sur la sensibilité des abeilles au thiaclopride et à la deltaméthrine. À ce jour aucune approche de ce genre n'a été effectuée, probablement à cause de la quantité de travail que cela exige. L'approche a constitué à identifier des colonies naturellement infectées par *N. ceranae* et présentant un fort taux d'infestation. Des ouvrières prélevées dans ces colonies ont ensuite été exposées aux insecticides purs. Les expérimentations ont donc été réalisées sur des mélanges d'abeilles infectées et non infectées. C'est seulement à la fin des manipulations que le statut infectieux des individus a été connu.

Pour sélectionner des colonies avec des taux d'infestation importants, le travail a été réalisé à la Réunion où la prévalence de *N. ceranae* est de 100%, c'est-à-dire que toutes les colonies sont porteuses du parasite (Esnault, 2018). Au sein des colonies, le taux d'infestation est cependant variable, allant de 7% à 81% des ouvrières porteuses de spores (N. Blot, communication personnelle). Des abeilles ont été prélevées (n=30 environ) dans 25 colonies localisées sur plusieurs ruchers de l'UMR PVBMT. Le taux d'infestation des colonies a été estimé par la détection au microscope (x400) de spores dans l'ampoule rectale des abeilles. Sept colonies présentant un taux d'infestation entre 40 et 60% ont été sélectionnées.

Les expérimentations ont été ensuite réalisées sur des abeilles prélevées dans ces colonies, maintenues en cagette et nourries avec une solution de saccharose *ad libitum*. Les traitements insecticides ont été effectués par voie topique. Les abeilles ont été anesthésiées au  $CO_2$  et 3 µL de substance diluée dans l'acétone ont été déposés sur leur thorax. De l'acétone pur a été déposé comme contrôle. Les abeilles ont ensuite été replacées dans les cagettes et des prélèvements ont été réalisés à différents temps, en conservant tous les individus morts ou prélevés. À la fin des expérimentations les contenus abdominaux de toutes les abeilles, mortes ou survivantes, ont été analysés par microscopie pour observer la présence ou l'absence de spores de *N. ceranae*.

### G.7.2.1. Effet de l'infection sur des expositions topiques aigües à la deltamethrine

Une première expérimentation avait pour objectif de determiner si l'infection par *N. ceranae* modifie la LD<sub>50</sub> des insecticides. Pour des raisons matérielles, un seul insecticide, la deltaméthrine a pu être étudié. Des doses croissantes de l'insecticide (entre 20 et 160 ng/ab) ont été déposées par voie topique sur le thorax d'ouvrières (n=90 à 102 par dose) de trois colonies différentes. La mortalité a été mesurée après 24 et 48h pour estimer la LD<sub>50</sub> puis la recherche de parasite a été effectuée dans tous les individus. Les LD<sub>50</sub> moyennes obtenues étaient de 84,8 (IC<sub>95</sub> 73,6-94,6) et de 80,1 (IC<sub>95</sub> 51,9-87,0) ng/ab de deltaméthrine respectivement pour les abeilles saines et infectées. L'infection par *N. ceranae* n'a pas modifié significativement la LD<sub>50</sub> de la deltaméthrine (tests statistiques appariés). Le parasite n'a donc pas sensibilisé les abeilles à une exposition topique aigüe à la deltaméthrine.

Afin d'observer d'éventuels effets dose-réponse, en présence et en absence de *N. ceranae*, des têtes ont été prélevées 24 h après une exposition topique à 0, 20, 40, 80 et 120 ng/ab de deltaméthrine (les autres doses n'ont pas été testées). Pour chaque condition, des extraits protéiques regroupant 4 têtes ont été préparés, et les concentrations en protéines ont été mesurées. Les activités tissulaires (par masse de tissu) et spécifiques (par masse de protéines) AChE et GST ont été dosées. Les manipulations ont été répétées pour quatre colonies. *N. ceranae* a induit une augmentation de l'activité spécifique GST, et non de l'activité tissulaire, à la dose de deltaméthrine la plus forte seulement (120 ng/ab). L'activité tissulaire AChE a montré une légère diminution, à peine significative, pour les groupes expérimentaux exposés à 20 et 80 ng/ab de deltaméthrine, en absence de *N. ceranae* seulement.

### G.7.2.2. Dynamique d'une exposition aux insecticides sur cinq jours

Une autre expérimentation a été réalisée afin d'étudier la cinétique de la réponse à une exposition topique à un mélange comprenant la deltaméthrine et le thiaclopride, en présence et en absence de *N. ceranae*. Le mélange a été choisi pour faire le lien avec le Proteus<sup>®</sup> dont la formulation ne peut en elle-même être déposée sur le thorax. Outre les contrôles (acétone seule), deux dépôts ont été appliqués sur les abeilles : le premier avec 1,5 ng de deltaméthrine et 15 ng et de thiaclopride par abeille, le deuxième avec 10 fois plus de chaque substance. Quatre abeilles ont été prélevées au temps 0 puis 1; 2; 4; 7; 10; 24 et 120 h après l'application du traitement. Elles ont été disséquées pour ensuite rassembler leurs têtes, leurs intestins moyens et pour le dernier prélèvement (120 h) leurs intestins postérieurs. Ces derniers ont notamment permis d'observer la présence ou l'absence de spores de *N. ceranae* pour identifier les abeilles infectées ou non. Les expériences ont été répliquées sur 5 colonies. La présence de *N. ceranae* n'a pas induit de différence significative sur la mortalité provoquée par les traitements insecticides.

Les activités spécifiques (mais non tissulaires) AChE et GST dans les têtes ont montré une augmentation significative à 120 h par rapport aux temps précédents, pour toutes les

conditions testées. Dans l'intestin, l'activité tissulaire GST a montré une légère augmentation transitoire à 2 h et l'activité spécifique augmentait à partir de 24h mais non significativement. **Aucun effet de** *N. ceranae* **ou des insecticides sur les activités AChE et GST** n'a été observé.

L'ARN a été extrait pour les têtes et les intestins moyens prélevés 10 h et 120 h, puis l'ADN complémentaire a été synthétisé pour évaluer **l'expression de gènes** choisis. Dans l'intestin moyen à 120 h, l'expression de LOC411182 (Ubiquitin-protein ligase E3A) augmente significativement suite aux traitements insecticides, mais seulement en absence de *N. ceranae*. L'expression de LOC725936 (titin homolog) est activée en présence du parasite mais seulement chez les abeilles exposées à la dose forte d'insecticides. Les autres gènes testés dans l'intestin moyen (LOC411694, LOC412815, LOC410175, **Suppl. Table S1**) ou dans la tête (LOC411182, LOC411694, LOC726269) n'ont pas montré de modification de leur expression. Cependant, le choix des gènes ciblés n'était possiblement pas le meilleur pour observer une dynamique dans les premiers jours suivant l'exposition.

L'abondance de 4 groupes majoritaires du microbiote intestinal a été évaluée dans l'intestin postérieur des abeilles 120 h après le dépôt des insecticides. L'abondance de **Bifidobacterium spp.** était réduite chez les abeilles à la fois infectées et exposées au traitement insecticide le plus faible par rapport aux abeilles non traitées, mais pas par rapport aux abeilles uniquement infectées ou intoxiquées. Les autres groupes étudiés (*Lactobacillus* spp., *G. apicola*, *S. alvi*) n'ont pas montré de variation significative de leur abondance.

# **H. DISCUSSION GÉNÉRALE**

# H.1. La plus forte sensibilité du microbiote chez les ouvrières émergentes et en hiver serait-elle un facteur aggravant à la sortie de l'hivernage ?

Les travaux réalisés durant la thèse ont mis en évidence, pour la première fois, un impact significatif de *N. ceranae*, conforté par la suite (Rubanov *et al.*, 2019), et d'une exposition chronique aux insecticides sur le microbiote intestinal de l'abeille. Ces modifications étaient cependant modulées selon le type d'abeilles, avec une réponse qui paraissait plus conséquente chez les **abeilles d'hiver** et chez les abeilles **émergentes** par rapport aux abeilles d'été plus âgées (*cf.* F.4, F.5.1, F.7.1.1).

La sensibilité du microbiote des abeilles émergentes pourrait être lié au fait que celui-ci est en phase d'installation, mettant environ 6 jours à se stabiliser (*cf.* B.3.2). L'abondance et la diversité des communautés bactériennes du microbiote de l'ouvrière varient avec la **saison** (*cf.* F.4 ; Kešnerová *et al.*, 2020). L'incidence de la saison serait liée à la physiologie et à l'environnement de l'abeille (*cf.* B.3.2 ; Jones *et al.*, 2018). Les ouvrières à l'hivernage, qui restent groupées dans la colonie et se nourrissent de réserves, ont une physiologie différente de celles d'été, avec par exemple un corps gras plus conséquent et une durée de vie plus longue. La succession des saisons s'accompagne en outre de variations des conditions climatiques et paysagères, et surtout des ressources disponibles. Or, les ressources consommées ont un impact sur le microbiote (Wang *et al.*, 2020).

L'étude de l'impact de facteurs de stress sur le microbiote de l'abeille nécessite donc de bien distinguer le type d'abeilles et le moment de l'exposition. Dans le cas de *N. ceranae*, le parasite semble plus présent au printemps, à la sortie de l'hivernage (*cf.* C.2.3). C'est également au printemps que débutent les premiers traitements insecticides (*cf.* D.3.3). Ce moment semble donc crucial dans la réussite de l'hivernage et c'est là que sont souvent découvertes les pertes de colonies. Or, c'est justement à cette période que sont encore présentes les abeilles âgées de l'hiver et qu'une nouvelle génération d'abeilles émerge, toutes avec un microbiote potentiellement plus sensible. Une plus forte sensibilité de ces abeilles avait d'ailleurs été observée en réponse à un traitment aigu à des néonicotinoïdes (Baines *et al.,* 2017). Il semble donc intéressant d'étudier la combinaison de ces facteurs de stress à cette **période de transition** entre l'hivernage et la reprise de l'intense activité de butinage.

# **H.2.** Comment expliquer la réponse commune de certaines bactéries à différents facteurs de stress ?

L'abondance de certains genres bactériens semble répondre de manière similaire à des pathogènes et à des substances phytopharmaceutiques. C'est notamment le cas des **bactéries lactiques** (LAB). *N. ceranae* induit une diminution de l'abondance des *Bifidobacterium* et des *Lactobacillus*, le SBV celle des *Lactobacillus* et *M. plutonius* celle des *Bifidobacterium* (*cf.* F.4 ; Guo *et al.*, 2015). Le thiaclopride et le fongicide chlorothalonil induisent aussi une diminution des *Lactobacillus* et le glyphosate une diminution des deux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Kakumanu *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2020 ; Motta *et al.*, 2018). Dans ce travail, une diminution des *Lactobacillus* a également été observée en réponse au Proteus® chez les abeilles infectées (*cf.* G.4.6). Globalement, l'abondance de *G. apicola* semble répondre positivement aux insecticides, mais aussi à *N. ceranae*, à *L. passim*, et à un stress nutritionnel (*cf.* F.4 ; Maes *et al.*, 2016 ; Schwarz *et al.*, 2016 ; Paris *et al.*, 2020). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène.

Certains facteurs de stress peuvent avoir un **impact direct sur les bactéries du microbiote**. Cela a été démontré pour le glyphosate sur *S. alvi* (Motta *et al.,* 2018 ; Blot *et al.,* 2020) et cela semble évident pour les antibiotiques (voir par ex. Raymann *et al.,* 2017), qui agissent directemment sur de nombreuses bactéries possédant les cibles moléculaires de ces substances. Un tel potentiel bactériotoxique pourrait être testé *in vitro* sur cultures de souches isolées (*cf.* Annexe) mais il semble peu probable que des pesticides de familles si différentes et des pathogènes si variés induisent les mêmes effets directs sur les bactéries. De plus, l'effet, même faible, induit par une application de contact du Proteus® (*cf.* G.4.6) conforte l'hypothèse selon laquelle l'interaction directe insecticide-bactéries n'est pas nécessaire pour que le microbiote soit atteint.

Une autre hypothèse impliquerait un impact des facteurs de stress sur **le tissu intestinal**, qui induirait une réponse de son microbiote. *N. ceranae* et les insecticides ont tous des impacts sur le métabolisme énergétique, sur l'intégrité de l'épithélium intestinal et de la membrane péritrophique, sur le renouvellement cellulaire, sur l'immunité et la détoxication (*cf.* C.4, D.4). Nous avons aussi vu une réponse commune de nombreux groupes fonctionnels par une approche transcriptomique (*cf.* G.4.3). De tels impacts communs pourraient induire des modifications similaires sur le microbiote en modifiant, positivement ou négativement, les conditions de développement des bactéries. C'est notamment le cas au niveau du système immunitaire, avec l'induction de l'expression d'AMP. La diminution des LAB pourrait résulter d'une telle production d'AMP et il serait intéressant de connaitre leur quantité et leur spécificité envers les différentes espèces bactéries à Gram positif (Xu *et al.*, 2009). La diminution des LAB pourrait en retour favoriser le développement d'autres espèces, comme les Gammaprotéobactéries, en laissant des niches écologiques vacantes.

Enfin, l'effet à distance d'une exposition de contact au Proteus<sup>®</sup> suggère que le microbiote répond à un neurotoxique induisant une **réponse systémique de l'insecte**. L'intestin et le microbiote seraient alors indirectement affectés par un état de stress général, indépendant de son origine. Cet effet indirect d'un neurotoxique sur le microbiote rappelle le concept d'**axe microbiote-intestin-cerveau** (Wiley *et al.,* 2017). Il serait alors intéressant de voir si une modification du microbiote modifie en retour le comportement de l'abeille, sachant qu'une corrélation a été faite entre la composition du microbiote et les activités de butinage ou d'intérieur (Jones *et al.,* 2018).

# **H.3.** Pourquoi n'observe-t-on pas toujours une synergie entre *N. cerane* et les insecticides ?

Les interactions entre *N. ceranae* et les insecticides ne s'accompagnent pas nécessairement d'effet synergique (*cf.* E.2.3). De plus, les mortalités induites par *N. ceranae* et les insecticides sont très variables d'une étude à l'autre, comme avec le Proteus<sup>®</sup> entre l'expérimentation préliminaire et celle de l'article (*cf.* G.4.1, G.7.1). De telles variabilités ont été observées en réponse à l'infection par *N. ceranae* (*cf.* C.5.1). L'origine de ces variations dans la réponse aux facteurs de stress et à leur combinaison peut provenir de ces facteurs eux-mêmes et de l'environnement dans lequel se fait l'interaction, c'est-à-dire de l'abeille.

# H.3.1. Le développement du pathogène

Il y a eu synergie sur la mortalité entre *N. ceranae* et le Proteus<sup>®</sup>, mais pas entre *N. ceranae* et le Décis<sup>®</sup> ou le Calypso<sup>®</sup> (*cf.* G.4.1). Une hypothèse qui a été soulevée pour expliquer cette observation est le **développement moins important du pathogène** dans la deuxième expérimentation, illustrée par une charge parasitaire moins élevée. Rappelons que la synergie est loin d'être systématiquement associée à une plus forte charge parasitaire, c'est-à-dire que les insecticides ne favorisent pas toujours le développement du parasite (*cf.* E.2.3). Cependant, dans notre cas, le parasite aurait pu avoir un développement réduit induisant une sensibilisation moindre aux insecticides. D'autres hypothèses concernant la virulence variable du parasite ont été discutées (*cf.* C.5).

# H.3.2. Formulation vs substance active : quels sont les effets des adjuvants ?

Il peut exister une différence de toxicité entre une substance active (s.a.) et une formulation comprenant cette s.a. mais aussi des **adjuvants**. Or, peu d'informations sont généralement disponibles sur ces adjuvants et leurs quantités dans les formulations, puisque le fournisseur n'est pas tenu de les citer. Pour le Proteus<sup>®</sup>, le fabriquant met en avant quatre adjuvants censés augmenter l'efficacité de la formulation : un émulsifiant, un agent dispersant (surfactant), un agent pénétrant (perméabilisant les surfaces foliaires), et une huile augmentant la résistance au lessivage. Les adjuvants peuvent augmenter la toxicité des néonicotinoïdes (Chen *et al.,* 2019) et certains auraient même une toxicité directe sur les

abeilles (Mullin *et al.,* 2015). La quantité d'adjuvants variant avec la formulation utilisée et avec la dilution effectuée pour une exposition, leur effet peut grandement affecter les résultats. Par exemple les formulations Décis<sup>®</sup> et le Calypso<sup>®</sup>, qui ont montré une synergie entre elles mais pas avec *N. ceranae*, comprennent des s.a. plus concentrées et ont donc été plus fortement diluées pour les expérimentations. S'il parait intéressant d'étudier des formulations dans le cas d'exposition de contact, les effets des adjuvants sont encore largement méconnus.

# H.3.3. Les limites d'un modèle biologique mal contrôlé

L'ensemble de ces variabilités pourraient enfin, et surtout, être lié au protocole expérimental et au modèle biologique étudié. Par exemple, l'anesthésie au CO<sub>2</sub> peut induire de la mortalité (Milbrath *et al.*, 2013), comme celle observée dans les modalités contrôles qui aurait masqué l'effet des insecticides (*cf.* G.4.1). Plus généralement, l'abeille répond de manière très variable aux facteurs de stress, y compris à l'anesthésie. Cela dépend à la fois de son génome et des conditions environnementales.

Il n'existe pas de système de culture *in vitro* d'abeille comme pour *D. melanogaster*. Les expérimentations sur ouvrières adultes sont donc réalisées sur des cohortes d'individus prélevés dans des colonies, voire sur des colonies entières, dont l'historique n'est pas vraiment maîtrisé. S'il est possible de contrôler les traitements apicoles, il n'en est pas de même des **conditions environnementales** qui influent sur les ressources exploitées, les contaminants rapportés à la ruche, etc., qui ont un effet sur la physiologie de l'abeille et de son microbiote. En réalité, les abeilles sont confrontées à de nombreux autres facteurs de stress que ceux appliqués et tous peuvent interagir (*cf.* E.1). De plus, chaque rucher, chaque colonie diffère des autres dans son historique.

Différentes approches sont appliquées par les chercheurs pour minimiser ces effets. Dans la plupart des travaux publiés, y compris ceux du 2<sup>e</sup> article (*cf.* G.3.1), les abeilles de différentes colonies sont mélangées pour s'affranchir de la **variabilité inter-colonies**. Cela permet de réduire la variance des résultats, et donc permet d'obtenir plus de résultats significatifs. Cependant, cela peut induire des biais. Par exemple, on ignore si la population étudiée demeure stable au cours de l'expérimentation ou si la sous-population d'une colonie meure plus vite qu'une autre. Une autre approche, utilisée dans les deux publications sur le microbiote (*cf.* F.3.1, Annexe), consiste au contraire à réaliser des réplications biologiques fondées sur des colonies distinctes. Les résultats sont alors beaucoup plus variables et moins significatifs mais une réponse identique dans toutes les colonies semble plus solide. Cette approche peut paraitre épistémologiquement plus proche de la réalisé que la première. Rappelons cependant qu'on ne critique pas autant les études réalisées sur des populations colonies comme *D. melanogaster*.

L'expérimentation avec le Décis<sup>®</sup> et le Calypso<sup>®</sup> a été conduite plus d'un mois après celle avec le Proteus<sup>®</sup>. La variation dans la réponse des abeilles pourrait aussi être due à une variation du **fond génétique** si la lignée paternelle (fratrie) a changé, bien que la succession des lignées patrilinéaires puisse être contestée (Brodschneider *et al.,* 2013). La différence du fond génétique est en tout cas réelle entre colonies, et l'on sait que ce fond peut agir sur la sensibilité à *N. ceranae* (Hatjina *et al.,* 2014). L'utilisation de colonies issues de reines fécondées de manière contrôlée pourrait diminuer ces effets.

# H.4. Comment expliquer la synergie entre facteurs de stress?

### H.4.1. La synergie deltaméthrine-thiaclopride

Étonnamment, la synergie entre la deltaméthrine et le thiaclopride sur la mortalité d'insectes ravageurs ne semble pas avoir été démontrée dans la littérature, bien que l'argument de l'efficacité du Proteus<sup>®</sup> repose sur la combinaison de ces deux substances. Il existe pourtant bien une interaction synergique entre le Decis<sup>®</sup> et le Calypso<sup>®</sup> sur la mortalité 24 h après exposition de contact, mais pas à plus long terme, avec un effet comparable au Proteus<sup>®</sup> (*cf.* F.4). Cette synergie s'explique probablement par les modes d'action distincts des néonicotinoïdes et des pyréthrinoïde, qui ciblent respectivement les récepteurs nAChR du SNC et de canaux ionotropes dépendants du voltage du SNP (*cf.* D.2). Les insecticides n'agissant pas sur les mêmes neurones, ils induiraient des dommages complémentaires.

### H.4.2. Qui de N. ceranae ou de l'insecticide sensibilise l'abeille à l'autre ?

Plusieurs synergies entre l'infection par *N. ceranae* et une exposition orale et chronique aux insecticides ont été décrites (*cf.* E.2.3). Ici *N. ceranae* et le Proteus<sup>®</sup> ont eu un effet synergique sur la mortalité des abeilles 24 h après une exposition de contact à la formulation insecticide (*cf.* G.4.1). Les deux facteurs de stress altérant la physiologie de l'abeille (*cf.* C.4, D.4), pouvant conduire à son affaiblissement, il est possible que l'un puisse sensibiliser cette dernière à l'autre. Dans la mesure où la synergie entre le parasite et le Proteus<sup>®</sup> s'est produite juste après l'exposition à l'insecticide, l'hypothèse la plus simple est que c'est plutôt le pathogène, déjà installé et développé, qui aurait sensibilisé les abeilles aux insecticides. En revanche, en exposant des abeilles de manière séquentielle à des spores de *N. ceranae* et au fipronil (1 mg.L<sup>-1</sup> OC), Aufauvre *et al.* (2012) ont montré que les deux facteurs de stress agissaient en synergie sur la mortalité quel que soit l'ordre des traitements, suggérant que chacun sensibilise les abeilles à l'autre. Toutefois, il n'est pas nécessaire d'invoquer une sensibilisation de l'abeille par un facteur de stress envers un autre pour expliquer une synergie, celle-ci pouvant dépendre de la combinaison de leurs effets, comme cela a été suggéré plus haut pour la combinaison de la deltaméthrine et du thiaclopride.

### H.4.3. Le microbiote serait-il un facteur de synergie ?

La **dysbiose** désigne le déséquilibre des communautés de l'écosystème microbien intestinal. Elle peut s'accompagner d'une altération fonctionnelle du microbiote, qui intervient notamment dans la digestion, la stimulation de l'immunité ou la détoxication des insecticides (*cf.* B.3.3). En altérant ces fonctions, une dysbiose pourrait donc sensibiliser les abeilles à d'autres facteurs de stress et ainsi constituer un facteur de synergie. Par exemple le glyphosate induirait une sensibilisation des abeilles à *S. marcescens* mais pas à *N. ceranae* (Motta *et al.,* 2018 ; Blot *et al.,* 2019). Il apparait donc essentiel de considérer le microbiote lorsque l'on étudie la réponse de l'abeille aux facteurs de stress et à leur combinaison.

# H.4.4. Quelles fonctions cellulaires influent sur l'interaction ?

Les résultats obtenus dans ce travail ou disponibles dans la littérature ont montré que *N. ceranae* et les insecticides induisent chez l'abeille une modulation de gènes ou d'activité associés à la détoxication, à l'immunité, aux métabolismes énergétiques, des lipides et des carbohydrates (*cf.* G.4.3, C.4, C.4.2 ; D.4). L'action combinée du parasite et du Proteus<sup>®</sup> a en outre montré une réponse plus forte du transcriptome, avec une répression globale de l'expression qui reste à expliquer, et une modulation plus spécifique de gènes liés au système ubiquitine-protéasome (UPS, *ubiquitin-proteasome system*) et à la phosphorylation oxydative. L'analyse transcriptomique permet donc de formuler des hypothèses sur l'impact des facteurs de stress et de leur combinaison qui nécessiteraient d'être vérifiées par des approches fonctionnelles.

# H.4.4.1. La phosphrylation oxydative est-elle réduite par la combinaison parasite-insecticide ?

La répression significative de gènes liés à la phosphorylation oxydative en réponse à la combinaison du pathogène et des insecticides peut exprimer une altération de la capacité des cellules intestinales à accomplir la respiration cellulaire productrice d'ATP, dont le parasite est dépendant (*cf.*C.1.2). Une telle altération aurait un impact très important sur la survie et l'activité cellulaires. Il apparait essentiel de vérifier si la chaîne respiratoire est effectivement atteinte dans l'intestin en réponse au double traitement. Pour cela il est possible de mesurer l'activité respiratoire à différentes échelles. Par exemple, un marqueur fluorescence du potentiel membranaire (gradient de proton), comme le JC-1, permettrait de visualiser l'activité des mitochondries sur des coupes histologiques en microscopie à épifluorescence (Perry *et al.,* 2011). Il est aussi possible de mesurer la consommation de O<sub>2</sub> sur des mitochondries isolées, des cellules, des tissus et même *in vivo* sur des abeilles (Moffatt & Núñez, 1997).

### H.4.4.2. Le système ubiquitine-protéasome est-il inhibé par la combinaison parasite-insecticide ?

La modulation de l'UPS, spécifique au double traitement, pourrait refléter un plus grand renouvellement des protéines, en réponse à des dommages ou dans un contexte d'autophagie ou d'apoptose. Afin de vérifier si l'activité du protéasome est altérée, il est possible de mesurer l'activité protéase dans des extraits intestinaux, avec ou sans inhibiteur

du protéasome comme le MG-132. Il est également possible de mesurer l'activité ubiquitine ligase E3 (dont les gènes sont les plus modulés) ou d'utiliser des anticorps anti-ubiquitine pour mesurer l'ubiquitination des protéines.

#### H.4.4.3. Le métabolisme des lipides est-il plus altéré en réponse au double traitement ?

Les lipides interviennent dans le métabolisme énergétique, dans la composition des membranes, et dans l'immunité. Les microsporidies ne possèdent pas les gènes impliqués dans l'anabolisme et l'oxydation des acides gras (Nakjang *et al.*, 2013). L'effet de *N. ceranae* sur ce métabolisme, déjà suggéré auparavant (Badaoui *et al.*, 2017), mériterait d'être étudié. En effet, chez *D. melanogaster*, la microsporidie *T. ratisbonensis* utilise les lipides de son hôte et la quantité d'acides gras est le facteur limitant sa prolifération (Franchet *et al.*, 2019). L'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides était régulée en réponse à *N. ceranae*, mais plus encore en réponse au double traitement parasite-Proteus® (*cf.* G.4.3.8). Il serait intéressant de comparer la quantité d'acides gras présente dans l'intestin, mais aussi dans un organe de réserve comme le corps gras, en détectant par exemple les gouttelettes lipidiques en microscopie à épifluorescence par marquage au rouge du Nil (Franchet *et al.*, 2019). Une approche métabolomique, initiée au laboratoire avec des abeilles infectées et/ou exposées au fipronil, permettrait d'étudier la variation de l'abondance de métabolites associés aux acides gras.

#### H.4.4.4. Les fonctions intestinales sont-elles altérées par N. cerane et/ou les insecticides?

N. ceranae et les insecticides induisent, dans l'intestin moyen, une modulation, plutôt négative, de l'expression de gènes impliqués dans l'intégrité cellulaire et tissulaire. Les données cyto- et histologiques vont dans le sens d'une dégénérescence de l'épithélium intestinal (cf. C.4.3, D.4.2). Le Proteus® active en outre l'expression de gènes liés au cytosquelette et/ou aux structures musculaires. L'effet de la deltaméthrine et des néonicotinoïdes sur les muscles locomoteurs est connu (Charreton et al., 2015 ; Tosi et al., 2017). La deltaméthrine semble en outre induire un détachement des muscles viscéraux de la membrane basale l'intestin moyen (Aljedani et al., 2017). Avec les modifications possibles du microbiote, il semble donc que l'ensemble de l'intestin moyen soit physiologiquement atteint. Le microscope électronique à balayage permettrait de visualiser les tissus endommagés. La détection de l'actine (par ex. avec la phalloidine-rhodamine) et des troponines (avec des anticorps conjugués) permettrait d'observer les modifications dans les structures musculaires. Cependant, il serait surtout intéressant d'observer les conséquences fonctionnelles de ces altérations. Par exemple la détection dans l'hémolymphe d'un marqueur fluorescent ingéré permettrait d'évaluer si la barrière intestinale est toujours fonctionnelle ou si elle est perméabilisée. Le plus intéressant serait d'évaluer les capacités d'absorption des nutriments ou des insecticides mais cela nécessiterait des approches plus lourdes (par ex. par marquage radioactif).

# H.5. Comment interagissent le parasite et les insecticides dans la colonie ?

L'impact et les interactions de facteurs de stress qui seraient avérés en laboratoire ne reflètent pas forcément l'impact et les interactions qui ont lieu à l'échelle de la colonie. Comme déjà mentionnée, la colonie présente une **capacité de résilience** par sa capacité à lutter contre les facteurs de stress (immunité, comportement hygiénique) et à compenser les pertes subies (ponte de la reine).

L'étude de l'interaction entre *N. ceranae* et le Proteus® en **conditions de terrain semicontrôlées** donnerait une information plus représentative d'une situation réaliste. Afin de limiter les variations liées aux facteurs environnementaux, des colonies ou des nuclei, infectés ou non par *N. ceranae*, peuvent être étudiés sous tunnel à la sortie de l'hivernage (*cf.* H.1). Les abeilles pourraient préférentiellement être exposées à des plants traités par pulvérisation au Proteus® ou, à défaut, à du pollen contaminé avec la formulation. L'impact des facteurs de stress, seuls ou combinés, peut être étudié par un suivi de la mortalité, de la consommation, du développement de la colonie (estimations de la population, du couvain et des réserves par la méthode ColEval ; Maisonnasse *et al.,* 2016). La prévalence de *N. ceranae* et éventuellement d'autres pathogène (Varroa, virus, etc.) peut aussi être suivie au sein de la colonie. À terme, une analyse de résidus dans les matrices (pollen, cire, abeille) offrirait une information sur la translocation des insecticides. À l'échelle individuelle, des abeilles peuvent être prélevées pour suivre des paramètres physiologiques, comme des activités enzymatiques, la composition du microbiote, ou les fonctions liées à l'interaction parasiteinsecticides (*cf.* H.3.4).

# REFERENCES BILBIOGRAPHIQUES

- Abrol DP, 2013. Beekeeping: A Compressive Guide to Bees and Beekeeping. Jodhpur: Scientific Publishers (India).
- Adjlane N, Doumandji S, 2012. La prévalence de la nosémose dans les colonies d'abeilles Apis mellifera intermissa dans la région médio- septentrionale de l'algérie. Lebanese Science Journal 13, 9.
- Adjlane N, Haddad N, 2014. The first data on hygienic behavior of *Apis mellifera* intermissa in Algeria. *Journal of Biology and Earth Sciences* 4, B1–B5.
- Ahmed NE, Kanan HO, Inanaga S, Ma YQ, Sugimoto Y, 2001. Impact of pesticide seed treatments on aphid control and yield of wheat in the Sudan. *Crop Protection* **20**, 929–934.
- Aizen MA, Harder LD, 2009. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology* **19**, 915–918.
- Alaux C, Brunet J-L, Dussaubat C et al., 2010. Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera). Environmental Microbiology **12**, 774–782.
- Alburaki M, Bertrand B, Legout H *et al.*, 2013. A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC Genetics* **14**, 117.
- Aliferis KA, Copley T, Jabaji S, 2012. Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Insect Physiology* **58**, 1349–1359.
- Aliouane Y, el Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M, 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 113.
- Aljedani DM, 2017. Effects of abamectin and deltamethrin to the foragers honeybee workers of *Apis mellifera* jemenatica (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences* **24**, 1007–1015.
- Aljedani DM, Almehmadi RM, 2016. Effects of some insecticides on longevity of the foragers honey bee worker of local honey bee race *Apis mellifera* jemenatica. *Electronic Physician* **8**, 1843–1849.
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R *et al.*, 1998. The Potential Consequences of Pollinator Declines on the Conservation of Biodiversity and Stability of Food Crop Yields. *Conservation Biology* **12**, 8–17.
- Anadón A, Arés I, Martínez MA, Martínez-Larrañaga MR, 2013. Pyrethrins and Synthetic Pyrethroids: Use in Veterinary Medicine. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, eds. *Natural Products*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 4061–4086.
- Anderson KE, Rodrigues PAP, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V, 2016. Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in Lactobacillus Strain Dominance During Early Adult Development. *Microbial Ecology* **71**, 1008–1019.
- Annoscia D, Brown SP, Di Prisco G *et al.*, 2019. Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20190331.
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M, 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). *Environmental Microbiology* 11, 2284–2290.
- Ares AM, Nozal MJ, Bernal JL, Martín-Hernández R, M. Higes, Bernal J, 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema* spp. infected colonies. *Journal of Chromatography B* **899**, 146–153.
- Aufauvre J, Biron DG, Vidau C et al., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee. Scientific Reports 2, 326.
- 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 (G Smagghe, Ed,). *PLoS One* **9**, e91686.
- Badaoui B, Fougeroux A, Petit F et al., 2017. RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae* (O Rueppell, Ed,). *PLOS ONE* **12**, e0173438.
- Badiou A, Meled M, Belzunces LP, 2008. Honeybee Apis mellifera acetylcholinesterase—A biomarker to detect deltamethrin exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 69, 246–253.
- Baines D, Wilton E, Pawluk A, de Gorter M, Chomistek N, 2017. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific Reports* **7**, 10979.
- Balbiani G, 1882. Sur les microsporidies ou psorospermies des Articulés. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* **95**, 1168–1171.
- Barlow SM, Sullivan FM, Lines J, 2001. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food and Chemical Toxicology* **39**, 407–422.
- Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R, 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **121**, 78–87.
- Bekele AZ, Mor SK, Phelps NBD, Goyal SM, Armién AG, 2015. A case report of *Nosema ceranae* infection in honey bees in Minnesota, USA. *Veterinary Quarterly* **35**, 48–50.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet J-L, 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* **43**, 348–370.
- Belzunces LP, Toutant JP, Bounias M, 1988. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation. *Biochemical Journal* **255**, 463–470.

- Berenbaum MR, Johnson RM, 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 51–58.
- Bernadou A, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M, 2009. Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology* 55, 1099–1106.
- Berry JA, Hood WM, Pietravalle S, Delaplane KS, 2013. Field-Level Sublethal Effects of Approved Bee Hive Chemicals on Honey Bees (*Apis mellifera* L) (G Smagghe, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e76536.
- Bevk D, Kralj J, Čokl A, 2012. Coumaphos affects food transfer between workers of honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* **43**, 465–470.
- Bhanu S, Archana S, Ajay K, Singh S, Vandana B, 2011. Impact of Deltamethrin on Environment, use as an Insecticide and its Bacterial degradation A preliminary study. *International Journal of Environmental Sciences* 1, 9.
- Biesmeijer JC, 2006. Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. *Science* **313**, 351–354.
- Blažytė-Čereškienė L, Skrodenytė-Arbačiauskienė V, Radžiutė S, Nedveckytė I, Būda V, 2016. Honey Bee Infection Caused by *Nosema* spp. in Lithuania. *Journal of Apicultural Science* **60**, 77–88.
- Blot N, Veillat L, Rouzé R, Delatte H, 2019. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota (O Rueppell, Ed,). *PLOS ONE* 14, e0215466.
- Böhme F, Bischoff G, Zebitz CPW, Rosenkranz P, Wallner K, 2018. Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany (N Desneux, Ed,). *PLOS ONE* **13**, e0199995.
- Boily M, Sarrasin B, DeBlois C, Aras P, Chagnon M, 2013. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research* **20**, 5603–5614.
- Bomtorin AD, Mackert A, Rosa GCC et al., 2014. Juvenile Hormone Biosynthesis Gene Expression in the corpora allata of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Female Castes (J Korb, Ed,). PLoS ONE **9**, e86923.
- Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D, 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **58**, 613–620.
- Bonilla-Rosso G, Paredes Juan C, Das S et al., 2019. Acetobacteraceae in the honey bee gut comprise two distant clades with diverging metabolism and ecological niches. Genomics.
- Bonmatin J-M, Giorio C, Girolami V *et al.*, 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 35–67.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER, 2003. A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry* **75**, 2027–2033.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M, 2013. Nosema spp. infection and its negative effects on honey bees (Apis mellifera iberiensis) at the colony level. Veterinary Research 44, 25.
- Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E *et al.*, 2012. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* **93**, 150–155.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1999. The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis melliferaL*.) by the Ectoparasitic MiteVarroa jacobsoniOud. Journal of Invertebrate Pathology **73**, 101–106.
- Boyle NK, Sheppard WS, 2017. A scientific note on seasonal levels of pesticide residues in honey bee worker tissues. *Apidologie* **48**, 128–130.
- Brandt A, Grikscheit K, Siede R, Grosse R, Meixner MD, Büchler R, 2017. Immunosuppression in Honeybee Queens by the Neonicotinoids Thiacloprid and Clothianidin. *Scientific Reports* **7**, 4673.
- Branstetter MG, Danforth BN, Pitts JP *et al.*, 2017. Phylogenomic Insights into the Evolution of Stinging Wasps and the Origins of Ants and Bees. *Current Biology* **27**, 1019–1025.
- Bravo J, Carbonell V, Valdebenito J *et al.*, 2014. Identification of *Nosema ceranae* in the Valparaíso District, Chile. *Archivos de medicina veterinaria* **46**, 487–491.
- Broderick N, Welchman D, Lemaitre B, 2009. Recognition and response to microbial infection in Drosophila. In: *Insect infection and immunity*. New York : Oxford University Press, 13–33.
- Brodschneider R, Arnold G, Hrassnigg N, Crailsheim K, 2012. Does Patriline Composition Change over a Honey Bee Queen's Lifetime? *Insects* **3**, 857–869.
- Brosi BJ, Delaplane KS, Boots M, de Roode JC, 2017. Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nature Ecology & Evolution* 1, 1250–1262.
- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML, 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **10**, 71–82.
- Budge GE, Shirley MDF, Jones B *et al.*, 2014. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen Melissococcus plutonius. *The ISME Journal* **8**, 1588–1597.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA *et al.*, 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622.
- Cameron SA, Sadd BM, 2020. Global Trends in Bumble Bee Health. Annual Review of Entomology 65, 209–232.

- Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**, 2117–2124.
- Casida JE, Durkin KA, 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology* **58**, 99–117.
- Casida JE, Quistad GB, 1998. Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future? Annual Review of Entomology 43, 1–16.
- Casida J, Quistad GB, 2004. Why Insecticides are More Toxic to Insects than People: The Unique Toxicology of Insects? *Journal of Pesticide Science* 29, 81–86.
- Catae AF, Roat TC, De Oliveira RA, Ferreira Nocelli RC, Malaspina O, 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Effects of Thiamethoxam in Honeybees. *Microscopy Research and Technique* **77**, 274–281.
- Cavigli I, Daughenbaugh KF, Martin M et al., 2016. Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie* **47**, 251–266.
- Celli G, Maccagnani B, 2003. Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* **56**, 137–139.
- Cepero A, Ravoet J, Gómez-Moracho T *et al.*, 2014. Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study. *BMC Research Notes* **7**, 649.
- Chagnon M, Kreutzweiser D, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Van der Sluijs JP, 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 119–134.
- Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS, 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. Journal of Insect Physiology 58, 1090–1095.
- Chaimanee V, Chen Y, Pettis JS, Scott Cornman R, Chantawannakul P, 2011. Phylogenetic analysis of *Nosema* ceranae isolated from European and Asian honeybees in Northern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* **107**, 229–233.
- Chaimanee V, Evans JD, Chen Y, Jackson C, Pettis JS, 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology* **89**, 1–8.
- Charbonneau LR, Hillier NK, Rogers REL, Williams GR, Shutler D, 2016. Effects of *Nosema apis*, N. ceranae, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific Reports* **6**, 22626.
- Charreton M, Decourtye A, Henry M et al., 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee Apis mellifera (JC Nieh, Ed,). PLoS One 10, e0144879.
- Chauzat M-P, Carpentier P, Martel A-C *et al.*, 2009. Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environmental Entomology* **38**, 514–523.
- Chauzat M-P, Jacques A, EPILOBEE Consortium *et al.*, 2016. Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie* **47**, 348–378.
- Chauzat M-P, Martel A-C, Cougoule N *et al.*, 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30**, 103–111.
- Chemurot M, De Smet L, Brunain M, De Rycke R, de Graaf DC, 2017. Nosema neumanni n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, Apis mellifera in Uganda. European Journal of Protistology 61, 13–19.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS, 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **97**, 186–188.
- Chen Y, Evans JD, Zhou L et al., 2009. Asymmetrical coexistence of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology **101**, 204–209.
- Chen L, Yan Q, Zhang J, Yuan S, Liu X, 2019. Joint Toxicity of Acetamiprid and Co-Applied Pesticide Adjuvants on Honeybees under Semifield and Laboratory Conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **38**, 1940–1946.
- Christen V, Joho Y, Vogel M, Fent K, 2019. Transcriptional and physiological effects of the pyrethroid deltamethrin and the organophosphate dimethoate in the brain of honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution* **244**, 247–256.
- Cizelj I, Glavan G, Božič J, Oven I, Mrak V, Narat M, 2016. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera* carnica Pollmann). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **128**, 68–75.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM *et al.*, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology* **15**, 615–636.
- Colin ME, 1999. Intoxications. In: Colin ME,, Ball B,, Kilani M, eds. Bee disease diagnosis. Options Méditerranéennes : Série B. Zaragoza: CIHEAM, 167–175.
- Colin M-E, Belzunces LP, 1992. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pesticide Science* **36**, 115–119.

- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP, 2004. A Method to Quantify and Analyze the Foraging Activity of Honey Bees: Relevance to the Sublethal Effects Induced by Systemic Insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**, 387–395.
- Collison EJ, Hird H, Tyler CR, Cresswell JE, 2018. Effects of neonicotinoid exposure on molecular and physiological indicators of honey bee immunocompetence. *Apidologie* **49**, 196–208.
- Core A, Runckel C, Ivers J et al., 2012. A New Threat to Honey Bees, the Parasitic Phorid Fly Apocephalus borealis (NE Raine, Ed,). PLoS ONE 7, e29639.
- Cornman RS, Chen YP, Schatz MC et al., 2009. Genomic Analyses of the Microsporidian Nosema ceranae, an Emergent Pathogen of Honey Bees (A Andrianopoulos, Ed,). PLoS Pathogens 5, e1000466.
- Corradi N, 2015. Microsporidia: Eukaryotic Intracellular Parasites Shaped by Gene Loss and Horizontal Gene Transfers. *Annual Review of Microbiology* **69**, 167–183.
- Corradi N, Haag KL, Pombert J-F, Ebert D, Keeling PJ, 2009. Draft genome sequence of the Daphnia pathogen Octosporea bayeri: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. *Genome Biology* **10**, R106.
- Corradi N, Keeling PJ, 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews* 23, 1–8.
- Corradi N, Pombert J-F, Farinelli L, Didier ES, Keeling PJ, 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian Encephalitozoon intestinalis. *Nature Communications* **1**, 77.
- Corradi N, Slamovits CH, 2010. The intriguing nature of microsporidian genomes. *Briefings in Functional Genomics* **10**, 115–124.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC et al., 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. Science **318**, 283–287.
- Cridland JM, Tsutsui ND, Ramírez SR, 2017. The Complex Demographic History and Evolutionary Origin of the Western Honey Bee, Apis mellifera. Genome Biology and Evolution 9, 457–472.
- Crotti E, Sansonno L, Prosdocimi EM et al., 2013. Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology* **30**, 716–722.
- Dada N, Sheth M, Liebman K, Pinto J, Lenhart A, 2018. Whole metagenome sequencing reveals links between mosquito microbiota and insecticide resistance in malaria vectors. *Scientific Reports* **8**, 2084.
- Dai P, Jack CJ, Mortensen AN, Bustamante TA, Ellis JD, 2018. Chronic toxicity of amitraz, coumaphos and fluvalinate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. *Scientific Reports* **8**, 5635.
- Dai P-L, Wang Q, Sun J-H *et al.*, 2010. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 644–649.
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse (PV Aguilar, Ed,). *PLoS ONE* **7**, e32151.
- Daisley BA, Trinder M, McDowell TW, Collins SL, Sumarah MW, Reid G, 2018. Microbiota-mediated modulation of organophosphate insecticide toxicity by species-dependent lactobacilli interactions in a *Drosophila* melanogaster insect model. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, e02820-17.
- D'Alvise P, Seeburger V, Gihring K, Kieboom M, Hasselmann M, 2019. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecology and Evolution* **9**, 10241–10252.
- De Smet L, Hatjina F, Ioannidis P *et al.*, 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 (DE Riechers, Ed,). *PLOS ONE* **12**, e0171529.
- Debevec AH, Cardinal S, Danforth BN, 2012. Identifying the sister group to the bees: a molecular phylogeny of Aculeata with an emphasis on the superfamily Apoidea: Phylogeny of Aculeata. *Zoologica Scripta* **41**, 527–535.
- Decourtye A, Devillers J, 2010. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In: Thany SH, ed. Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. New York, NY: Springer New York, 85–95.
- Decourtye A, Devillers J, Aupinel P et al., 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* **20**, 429–437.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H, 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 410–419.
- Decourtye A, Devillers J, Genecque E *et al.*, 2005a. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **48**, 242–250.
- Decourtye A, Gauthier M, Aupinel P, 2009. Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze Hazards of pesticides to bees 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. *Julius-Kühn-Archiv* **423**, 75–83.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue M-H, 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season: Effects of imidacloprid on learning performances of honeybees. *Pest Management Science* 59, 269–278.

- Decourtye A, Tisseur M, Taséi J, et al., 2005b. Toxicité et risques liés à l'emploi de pesticides chez les pollinisateurs : cas de l'abeille domestique. In: Regnault-Roger C, ed. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement au XXI<sup>o</sup> siècle*. Paris: Tec et Doc Lavoisier, 283–299.
- Decourtye A, Vidau C, Rollin O *et al.*, 2016. Fréquentation des cultures par les abeilles mellifères et sauvages : synthèse des connaissances pour réduire le risque d'intoxication aux pesticides. *Cahiers Agricultures* **25**, 44001.
- Déglise P, Grünewald B, Gauthier M, 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters* **321**, 13–16.
- Denholm I, Cahill M, Dennehy TJ, Horowitz AR, 1998. Challenges with managing insecticide resistance in agricultural pests, exemplisfied by the whitefly Bemisia tabaci (I Denholm, JA Pickett, AL Devonshire, Eds,). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **353**, 1757–1767.
- Derecka K, Blythe MJ, Malla S et al., 2013. Transient Exposure to Low Levels of Insecticide Affects Metabolic Networks of Honeybee Larvae (B Zhang, Ed,). PLoS ONE 8, e68191.
- Dermauw W, Van Leeuwen T, 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 89–110.
- Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y *et al.*, 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? (J Zeil, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e72016.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D *et al.*, 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 18466–18471.
- Diao Q, Li B, Zhao H *et al.*, 2018. Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: A Chinese case study. *Science of The Total Environment* **630**, 487–494.
- Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA, 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* **2**, 709–720.
- Didier ES, Weiss LM, 2008. Overview of microsporidia and microsporidiosis. Protistology 5, 243–255.
- Dively GP, Embrey MS, Kamel A, Hawthorne DJ, Pettis JS, 2015. Assessment of Chronic Sublethal Effects of Imidacloprid on Honey Bee Colony Health (N Desneux, Ed,). *PLOS ONE* **10**, e0118748.
- Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RFA, Paxton RJ, 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle: Pesticide-pathogen interactions in honey bees. *Environmental Microbiology* **17**, 969–983.
- Douglas A, 2012. Alimentary canal, digestion and absorption. In: *The insects: structure and function*. New York: Cambridge University Press, 46–80.
- Douglas MR, Sponsler DB, Lonsdorf EV, Grozinger CM, 2020. County-level analysis reveals a rapidly shifting landscape of insecticide hazard to honey bees (*Apis mellifera*) on US farmland. *Scientific Reports* **10**, 797.
- Douglas MR, Tooker JF, 2015. Large-Scale Deployment of Seed Treatments Has Driven Rapid Increase in Use of Neonicotinoid Insecticides and Preemptive Pest Management in U.S. Field Crops. *Environmental Science & Technology* **49**, 5088–5097.
- Dudley N, Alexander S, 2017. Agriculture and biodiversity: a review. *Biodiversity* 18, 45–49.
- Dussaubat C, Brunet J-L, Higes M et al., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium Nosema ceranae in the honey bee Apis mellifera (LA Moreira, Ed,). PLoS One 7, e37017.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C et al., 2010. Nosema spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (Apis mellifera). Journal of Chemical Ecology **36**, 522–525.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Crauser D *et al.*, 2013a. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 42–51.
- Dussaubat C, Sagastume S, Gómez-Moracho T *et al.*, 2013b. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology* **162**, 670–678.
- EFSA, 2012. Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal* **10**, 2752.
- EFSA, 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal* **11**, 3068.
- EFSA, 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees fort he active substance thiamethoxam considering all uses other than seed treatments and granules. *EFSA Journal* **13**, 4212.
- Eiri DM, Nieh JC, 2012. A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *The Journal of Experimental Biology* **215**, 2022–2029.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C, 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **82**, 30–39.
- Ellegaard KM, Engel P, 2019. Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications* **10**, 1–13.
- Ellis JD, Hepburn HR, 2006. An ecological digest of the small hive beetle (Aethina tumida), a symbiont in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux* **53**, 8–19.
- Elzen PJ, Baxter JR, Spivak M, Wilson WT, 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* **31**, 437–441.

- Elzen PJ, Westervelt D, 2002. Detection of coumaphos resistance in Varroa destructor in Florida. American Bee Journal 142, 291–292.
- Engel P, Bartlett KD, Moran NA, 2015. The Bacterium Frischella perrara Causes Scab Formation in the Gut of its Honeybee Host (MJ McFall-Ngai, Ed,). *mBio* 6, e00193-15.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA, 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 11002–11007.
- Esnault O, 2018. Diversité des agents pathogènes de l'abeille dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien dans un contexte d'invasion récente de Varroa destructor et mortalités associées.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP et al., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera. Insect Molecular Biology 15, 645–656.
- Evans JD, Spivak M, 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S62–S72.
- Eyer M, Chen YP, Schäfer MO, Pettis JS, Neumann P, 2009. Honey bee sacbrood virus infects adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Journal of Apicultural Research* 48, 296–297.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martín-Hernández R, del Aguila C, 2009. High-Level Resistance of *Nosema ceranae*, a Parasite of the Honeybee, to Temperature and Desiccation. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 6886–6889.
- Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C, Hoffmann JA, 2007. The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* **7**, 862–874.
- Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. Biochemical Society Transactions 34, 1252–1255.
- Fijen TPM, Scheper JA, Boom TM, Janssen N, Raemakers I, Kleijn D, 2018. Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as plant quality in a seed crop (R Irwin, Ed,). *Ecology Letters* **21**, 1704–1713.
- Fischer D, Moriarty T, 2011. *Pesticide risk assessment for pollinators: Summary of a SETAC Pellston Workshop*. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC).
- Fischer D, Moriarty T, 2014. Pesticide risk assessment for pollinators. Ames, Iowa.
- Fischer J, Müller T, Spatz A-K, Greggers U, Grünewald B, Menzel R, 2014. Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees (D Naug, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e91364.
- Flint ML, van den Bosch R, 1981. Introduction to Integrated Pest Management. New York.
- Flores JM, Gil-Lebrero S, Gámiz V, Rodríguez MI, Ortiz MA, Quiles FJ, 2019. Effect of the climate change on honey bee colonies in a temperate Mediterranean zone assessed through remote hive weight monitoring system in conjunction with exhaustive colonies assessment. *Science of The Total Environment* **653**, 1111–1119.
- Fontbonne R, Garnery L, Vidau C *et al.*, 2013. Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution* **17**, 188–194.
- Forfert N, Natsopoulou ME, Frey E, Rosenkranz P, Paxton RJ, Moritz RFA, 2015. Parasites and Pathogens of the Honeybee (*Apis mellifera*) and Their Influence on Inter-Colonial Transmission (O Rueppell, Ed,). *PLOS ONE* **10**, e0140337.
- Forkpah C, Dixon LR, Fahrbach SE, Rueppell O, 2014. Xenobiotic Effects on Intestinal Stem Cell Proliferation in Adult Honey Bee (*Apis mellifera* L) Workers (N Desneux, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e91180.
- Forsgren E, 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S5–S9.
- Forsgren E, Fries I, 2013. Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate: Temporal study of *Nosema* spp. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 78–82.
- Franchet A, Niehus S, Caravello G, Ferrandon D, 2019. Phosphatidic acid as a limiting host metabolite for the proliferation of the microsporidium Tubuli*Nosema* ratisbonensis in Drosophila flies. *Nature Microbiology* **4**, 645–655.
- Francis RM, Amiri E, Meixner MD *et al.*, 2014. Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary—a case study. *Journal of Apicultural Research* **53**, 230–232.
- Francis RM, Nielsen SL, Kryger P, 2013. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies (SJ Martin, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e57540.
- Franck P, Garnery L, Loiseau A *et al.*, 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity* **86**, 420–430.
- Franzen C, 2005. How do microsporidia invade cells? Folia Parasitologica 52, 36-40.
- Fries I, 1993. *Nosema apis* A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World* 74, 5–19.
- Fries I, 2010. Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). Journal of Invertebrate Pathology **103**, S73–S79.
- Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, *Nosema*tidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* **32**, 356–365.
- Gage SL, Kramer C, Calle S, Carroll M, Heien M, DeGrandi-Hoffman G, 2018. Nosema ceranae parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). The Journal of Experimental Biology 221, jeb161489.
- Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE, 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* **68**, 810–821.
- Garrido PM, Antúnez K, Martín M, Porrini MP, Zunino P, Eguaras MJ, 2013. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology* **59**, 113–119.
- Garrido PM, Porrini MP, Antúnez K *et al.*, 2016. Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Veterinary Research* **47**, 1–9.
- Genersch E, 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology* and *Biotechnology* 87, 87–97.
- Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H et al., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**, 332–352.
- Georghiou GP, Mellon RB, 1983. Pesticide Resistance in Time and Space. In: Georghiou GP,, Saito T, eds. *Pest Resistance to Pesticides*. Boston, MA: Springer US, 1–46.
- Ghosh S, Jung C-E, 2016. Global Honeybee Colony Trend is Positively Related to Crop Yields of Medium Pollination Dependence. *Journal of Apiculture* **31**, 85.
- Girolami V, Marzaro M, Vivan L *et al.*, 2013. Aerial powdering of bees inside mobile cages and the extent of neonicotinoid cloud surrounding corn drillers: Aerial powdering of bees in mobile cage. *Journal of Applied Entomology* **137**, 35–44.
- Gisder S, Aumeier P, Genersch E, 2009. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (Varroa destructor). Journal of General Virology **90**, 463–467.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A, Genersch E, 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and environmental microbiology* **76**, 3032–3038.
- Giurfa M, Sandoz J-C, 2012. Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory* **19**, 54–66.
- Glavan G, Božič J, 2013. The synergy of xenobiotics in honey bee Apis mellifera: mechanisms and effects. , 17.
- Goblirsch M, Huang ZY, Spivak M, 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection (GV Amdam, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e58165.
- Gollapudi B, Mendrala AL, Ann Linscombe V, 1995. Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutation Research/Genetic Toxicology* **342**, 25–36.
- Gong Y, Diao Q, 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* **26**, 1–12.
- Gordon J, Knowlton N, Relman DA, Rohwer F, Youle M, 2013. Superorganisms and Holobionts: Looking for a term for the functional entity formed by a macrobe and its associated symbiotic microbes and viruses? The term is "holobiont." *Microbe Magazine* **8**, 152–153.
- Goulson D, 2003. Effects of Introduced Bees on Native Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **34**, 1–26.
- Goulson D, 2013. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides (D Kleijn, Ed,). *Journal of Applied Ecology* **50**, 977–987.
- Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, 1255957–1255957.
- Graystock P, Yates K, Darvill B, Goulson D, Hughes WOH, 2013. Emerging dangers: Deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 114–119.
- Gregorc A, Alburaki M, Rinderer N *et al.*, 2018. Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports* **8**, 15003.
- Gregorc A, Ellis JD, 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **99**, 200–207.
- Gregorc A, Silva-Zacarin ECM, Carvalho SM, Kramberger D, Teixeira EW, Malaspina O, 2016. Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera* : A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere* **147**, 328–336.
- Grozinger CM, Flenniken ML, 2019. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. Annual Review of Entomology 64, 205–226.
- Grünewald B, Siefert P, 2019. Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids. *Insects* **10**, 420.
- Guez D, Belzunces LP, Maleszka R, 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **75**, 217–222.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces LP, 2001. Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* **76**, 183–191.
- Gunasekara AS, Truong T, Goh KS, Spurlock F, Tjeerdema RS, 2007. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science* **32**, 189–199.
- Guo J, Wu J, Chen Y *et al.*, 2015. Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees, *Apis cerana*. *Journal of Invertebrate Pathology* **127**, 110–114.
- Gupta R, 2006. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. New York.

- de Guzman LI, Williams GR, Khongphinitbunjong K, Chantawannakul P, 2017. Ecology, Life History, and Management of Tropilaelaps Mites. *Journal of Economic Entomology* **110**, 319–332.
- Hafi A, Millist N, Morey K, Caley P, Buetre B, 2012. A benefit-cost framework for responding to an incursion of Varroa destructor. Canberra: National Biosecurity Committee.
- Hagler JR, Mueller S, Teuber LR, Machtley SA, Van Deynze A, 2011. Foraging Range of Honey Bees, *Apis mellifera*, in Alfalfa Seed Production Fields. *Journal of Insect Science* **11**, 1–12.
- Hamdi C, Balloi A, Essanaa J et al., 2011. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. Journal of Applied Entomology 135, 524–533.
- Han P, Niu C-Y, Lei C-L, Cui J-J, Desneux N, 2010. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology* **19**, 1612–1619.
- Han F, Wallberg A, Webster MT, 2012. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology* and Evolution 2, 1949–1957.
- Han B, Weiss L, 2017. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. In: Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, Gow eds. *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, 97–113.
- Handford CE, Elliott CT, Campbell K, 2015. A review of the global pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards: Global Harmonization of Pesticide Legislation. Integrated Environmental Assessment and Management **11**, 525–536.
- Hatjina F, Bieńkowska M, Charistos L *et al.*, 2014. A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research* **53**, 337–363.
- Hatjina F, Tsoktouridis G, Bouga M *et al.*, 2011. Polar tube protein gene diversity among *Nosema ceranae* strains derived from a Greek honey bee health study. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 131–134.
- Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E, 2011. Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* **108**, 167–173.
- Hedtke SM, Patiny S, Danforth BN, 2013. The bee tree of life: a supermatrix approach to apoid phylogeny and biogeography. *BMC Evolutionary Biology* **13**, 138.
- Heinz E, Williams TA, Nakjang S *et al.*, 2012. The Genome of the Obligate Intracellular Parasite Trachipleistophora hominis: New Insights into Microsporidian Genome Dynamics and Reductive Evolution (PJ Johnson, Ed,). *PLoS Pathogens* **8**, e1002979.
- Hellmann JJ, Byers JE, Bierwagen BG, Dukes JS, 2008. Five Potential Consequences of Climate Change for Invasive Species. *Conservation Biology* **22**, 534–543.
- Hellou J, Lebeuf M, Rudi M, 2013. Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environmental Reviews* **21**, 53–69.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A, 2007. Experimental infection of Apis mellifera honeybees with Nosema ceranae (Microsporidia). Journal of Invertebrate Pathology 94, 211–217.
- Higes M, García-Palencia P, Urbieta A, Nanetti A, Martín-Hernández R, 2020. Nosema apis and Nosema ceranae Tissue Tropism in Worker Honey Bees (Apis mellifera). Veterinary Pathology 57, 132–138.
- Higes M, Martín R, Meana A, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* **92**, 93–95.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C et al., 2008. How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse: Natural Nosema ceranae infection. Environmental Microbiology **10**, 2659–2669.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**, 375–392.
- Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R, 2013. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen: *N. ceranae* an emergent pathogen for beekeeping. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 17–29.
- Holt HL, Aronstein KA, Grozinger CM, 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **14**, 799.
- Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Kleijn D, Tscharntke T, 2006. Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: effects of farming system, landscape composition and regional context: Pollinator diversity in organic farming. *Journal of Applied Ecology* **44**, 41–49.
- Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RFA, 2012. Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards N. ceranae infections. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 297–302.
- Huang Z-Y, Robinson GE, Tobe SS *et al.*, 1991. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology* **37**, 733–741.
- Huang W-F, Solter LF, 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 35–41.
- Hubert J, Bicianova M, Ledvinka O *et al.*, 2017. Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*. *Microbial Ecology* **73**, 685–698.
- Hung K-LJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR, 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**, 20172140.

- Inserm EC, 2013. *Pesticides : Effets sur la santé*. Paris.
- Invernizzi C, Abud C, Tomasco IH et al., 2009. Presence of Nosema ceranae in honeybees (Apis mellifera) in Uruguay. Journal of Invertebrate Pathology **101**, 150–153.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM, 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23**, 371–378.
- Jett DA, 2011. Neurotoxic Pesticides and Neurologic Effects. *Neurologic Clinics* **29**, 667–677.
- Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD, 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*) (NE Raine, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e54092.
- Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M, 2010. Pesticides and honey bee toxicity USA. *Apidologie* **41**, 312–331.
- Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F *et al.*, 2018a. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution* **8**, 441–451.
- Jones JC, Fruciano C, Marchant J *et al.*, 2018b. The gut microbiome is associated with behavioural task in honey bees. *Insectes Sociaux* **65**, 419–429.
- Jong DD, Morse RA, Eickwort GC, 1982. Mite Pests of Honey Bees. Annual Review of Entomology 27, 229–252.
- Kairo G, Biron DG, Abdelkader FB *et al.*, 2017. *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Scientific Reports* **7**, 1–14.
- Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA, 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology* **7**, 1255.
- Kapheim KM, Rao VD, Yeoman CJ *et al.*, 2015. Caste-Specific Differences in Hindgut Microbial Communities of Honey Bees (*Apis mellifera*) (EG Zoetendal, Ed,). *PLOS ONE* **10**, e0123911.
- Karazafiris E, Tananaki C, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasyvoulou A, 2008. Residue distribution of the acaricide coumaphos in honey following application of a new slow-release formulation. *Pest Management Science* **64**, 165–171.
- Kast C, Kilchenmann V, Droz B, 2020. Distribution of coumaphos in beeswax after treatment of honeybee colonies with CheckMite<sup>®</sup> against the parasitical mite *Varroa destructor*. *Apidologie* **51**, 112–122.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E *et al.*, 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite Encephalitozoon cuniculi. *Nature* **414**, 450–453.
- Keeling P, 2009. Five Questions about Microsporidia (HD Madhani, Ed,). PLoS Pathogens 5, e1000489.
- Keeling PJ, Corradi N, 2011. Shrink it or lose it: balancing loss of function with shrinking genomes in the microsporidia. *Virulence* **2**, 67–70.
- Keeling PJ, Fast NM, 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* **56**, 93–116.
- Keeling PJ, Slamovits CH, 2004. Simplicity and Complexity of Microsporidian Genomes. *Eukaryotic Cell* **3**, 1363–1369.
- Kent ML, Elliott DG, Groff JM, Hedrick RP, 1989. Loma salmonae (Protozoa: Microspora) infections in seawater reared coho salmon Oncorhynchus kisutch. *Aquaculture* **80**, 211–222.
- Kešnerová L, Emery O, Troilo M, Liberti J, Erkosar B, Engel P, 2020. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal* **14**, 801–814.
- Khan KA, Al-Ghamdi AA, Ghramh HA *et al.*, 2020. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial Pathogenesis* **138**, 103793.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, Fukatsu T, 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8618–8622.
- Kim YH, Cha DJ, Jung JW, Kwon HW, Lee SH, 2012. Molecular and Kinetic Properties of Two Acetylcholinesterases from the Western Honey Bee, *Apis mellifera* (J Vontas, Ed,). *PLoS ONE* **7**, e48838.
- Kjellberg F, Gouyon P-H, Ibrahim M, Raymond M, Valdeyron G, 1987. THE STABILITY OF THE SYMBIOSIS BETWEEN DIOECIOUS FIGS AND THEIR POLLINATORS: A STUDY OF *FICUS CARICA* L. AND *BLASTOPHAGA PSENES* L. *Evolution* **41**, 693–704.
- Klee J, Besana AM, Genersch E *et al.*, 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* **96**, 1–10.
- Kleijn D, Winfree R, Bartomeus I et al., 2015. Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. Nature Communications 6, 7414.
- Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH *et al.*, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**, 303–313.
- Klinger EG, Vojvodic S, DeGrandi-Hoffman G, Welker DL, James RR, 2015. Mixed infections reveal virulence differences between host-specific bee pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* **129**, 28–35.
- Koch RL, Burkness EC, Hutchison WD, Rabaey TL, 2005. Efficacy of systemic insecticide seed treatments for protection of early-growth-stage snap beans from bean leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) foliar feeding. *Crop Protection* **24**, 734–742.
- Kralj J, Fuchs S, 2010. Nosema sp. influences flight behavior of infected honey bee (Apis mellifera) foragers. Apidologie **41**, 21–28.

- Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K, 2012. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields (G Smagghe, Ed,). *PLoS ONE* **7**, e29268.
- Kühnholz S, Seeley TD, 1997. The control of water collection in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41**, 407–422.
- Kulhanek K, Steinhauer N, Rennich K *et al.*, 2017. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research* **56**, 328–340.
- Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C *et al.*, 2015. *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis (W Blenau, Ed,). *PLOS ONE* **10**, e0140174.
- Kurze C, Le Conte Y, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Moritz RFA, 2018. Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. *Journal of Invertebrate Pathology* **154**, 1–4.
- Kurze C, Mayack C, Hirche F *et al.*, 2016. *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research* **115**, 2381–2388.
- Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT, 2017. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, Galleria mellonella. *Insects* **8**, 61.
- Kwong WK, Engel P, Koch H, Moran NA, 2014. Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 11509–11514.
- Kwong WK, Moran NA, 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 374–384.
- Lambert O, 2012. Contamination chimique de matrices apicoles au sein de ruchers appartenant à des structures paysagères différentes.
- Lambert O, Piroux M, Puyo S *et al.*, 2013. Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France (N Desneux, Ed,). *PLoS One* **8**, e67007.
- Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A, 2011. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology* **64**, 107–113.
- Lautenbach S, Seppelt R, Liebscher J, Dormann CF, 2012. Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit (J Ollerton, Ed,). *PLoS ONE* **7**, e35954.
- Le Conte Y, Ellis M, Ritter W, 2010. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? Apidologie **41**, 353–363.
- Le Conte Y, Navajas M, 2008. Changements climatiques : impact sur les populations d'abeilles et leurs maladies. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* **27**, 485–497.
- Lecocq A, Jensen AB, Kryger P, Nieh JC, 2016. Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific Reports* **6**, 22042.
- Lee SC, Corradi N, Byrnes EJ *et al.*, 2008. Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi. *Current Biology* **18**, 1675–1679.
- Lee RCH, Gill EE, Roy SW, Fast NM, 2010. Constrained Intron Structures in a Microsporidian. *Molecular Biology* and Evolution 27, 1979–1982.
- Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G *et al.*, 2004. Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 17559–17564.
- Li J, Chen W, Wu J et al., 2012. Diversity of Nosema associated with bumblebees (Bombus spp.) from China. International Journal for Parasitology 42, 49–61.
- Li W, Evans JD, Li J, Su S, Hamilton M, Chen Y, 2017a. Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitology Research* **116**, 3265–3274.
- Li Z, Li M, He J *et al.*, 2017b. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **140**, 1–8.
- Liu G-Y, Ju X-L, Cheng J, 2010. Selectivity of Imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modeling. *Journal of Molecular Modeling* **16**, 993–1002.
- Liu Y-J, Qiao N-H, Diao Q-Y et al., 2020. Thiacloprid exposure perturbs the gut microbiota and reduces the survival status in honeybees. Journal of Hazardous Materials **389**, 121818.
- Llorens-Picher M, Higes M, Martín-Hernández R et al., 2017. Honey bee pathogens in Ghana and the presence of contaminated beeswax. Apidologie 48, 732–742.
- Locke B, Forsgren E, Fries I, de Miranda JR, 2012. Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 227–235.
- Lodesani M, Costa C, Besana A *et al.*, 2014. Impact of control strategies for *Varroa destructor* on colony survival and health in northern and central regions of Italy. *Journal of Apicultural Research* **53**, 155–164.
- Lodesani M, Costa C, Serra G, Colombo R, Sabatini AG, 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* **39**, 324–333.
- López JH, Krainer S, Engert A, Schuehly W, Riessberger-Gallé U, Crailsheim K, 2017. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Scientific Reports* **7**, 40853.
- Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Mougeot F, Mateo R, 2013. Experimental exposure of red-legged partridges (Alectoris rufa) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* **22**, 125–138.

- Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Mougeot F, Mateo R, 2015. Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environmental Research* **136**, 97–107.
- Lotfi A, Jamshidi R, Shahryar HA, Yousefkhani M, 2009. The Prevalence of Nosemosis in Honey Bee Colonies in Arasbaran Region (Northwestern Iran). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **5**, 255–257.
- Lozada-Chávez I, Stadler PF, Prohaska SJ, 2018. Genome-wide features of introns are evolutionary decoupled among themselves and from genome size throughout Eukarya. Evolutionary Biology.
- Lu C, Warchol KM, Callahan RA, 2014. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology* **67**, 125–130.
- Lüder CGK, Gross U, Lopes MF, 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite—host interactions. *Trends in Parasitology* **17**, 480–486.
- Maes PW, Rodrigues PAP, Oliver R, Mott BM, Anderson KE, 2016. Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and *Nosema* disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology* **25**, 5439–5450.
- Main AR, Headley JV, Peru KM, Michel NL, Cessna AJ, Morrissey CA, 2014. Widespread Use and Frequent Detection of Neonicotinoid Insecticides in Wetlands of Canada's Prairie Pothole Region (CJ Salice, Ed,). *PLoS ONE* 9, e92821.
- Maisonnasse A, Dangléant A, Hernandez J, Le-Quintrec C, Beri C, Cousin M, 2016. ColEval©(UMT Prade), un outil pour l'évaluation des colonies d'abeilles.
- Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR, 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). Proceedings of the National Academy of Sciences **108**, 12657–12662.
- Martel A-C, Zeggane S, Aurières C, Drajnudel P, Faucon J-P, Aubert M, 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar <sup>°</sup> or Asuntol <sup>°</sup> 50. *Apidologie* **38**, 534–544.
- Martin SJ, Hardy J, Villalobos E, Martín-Hernández R, Nikaido S, Higes M, 2013. Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically?: DWV and *Nosema* interactions. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 506–510.
- Martínez J, Leal G, Conget P, 2012. Nosema ceranae an emergent pathogen of Apis mellifera in Chile. Parasitology Research **111**, 601–607.
- Martín-Hernández R, Bartolomé C, Chejanovsky N *et al.*, 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* : a 12 years postdetection *perspective*: *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *Environmental Microbiology* **20**, 1302–1329.
- Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG *et al.*, 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?: Is N. ceranae replacing N. apis? *Environmental Microbiology* **14**, 2127–2138.
- Martín-Hernández R, Higes M, Sagastume S et al., 2017. Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis (E Ling, Ed,). PLOS ONE **12**, e0170183.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M, 2007. Outcome of Colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae. Applied and Environmental Microbiology 73, 6331–6338.
- Martinson VG, Moy J, Moran NA, 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 2830–2840.
- Mayack C, Naug D, 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal* of *Invertebrate Pathology* **100**, 185–188.
- Mayack C, Naug D, 2010. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* **56**, 1572–1575.
- Mayack C, Naug D, 2013. Individual energetic state can prevail over social regulation of foraging in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **67**, 929–936.
- McDonnell CM, Alaux C, Parrinello H *et al.*, 2013. Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecology* **13**, 25.
- McGowan J, De la Mora A, Goodwin PH *et al.*, 2016. Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *Journal of Microbiological Methods* **131**, 16–22.
- McGrady CM, Troyer R, Fleischer SJ, 2020. Wild Bee Visitation Rates Exceed Pollination Thresholds in Commercial Cucurbita Agroecosystems (J Strange, Ed,). *Journal of Economic Entomology* **113**, 562–574.
- McMenamin AJ, Flenniken ML, 2018. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. *Current Opinion in Insect Science* 26, 120–129.
- Meana A, Llorens-Picher M, Euba A et al., 2017. Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain. Spanish Journal of Agricultural Research **15**, e0501.
- Meixner MD, Francis RM, Gajda A *et al.*, 2014. Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *Journal of Apicultural Research* 53, 215–229.
- Milbrath MO, Xie X, Huang ZY, 2013. Nosema ceranae induced mortality in honey bees (Apis mellifera) depends on infection methods. Journal of Invertebrate Pathology **114**, 42–44.
- de Miranda JR, Cordoni G, Budge G, 2010. The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S30–S47.

- Moffatt L, Núñez JA, 1997. Oxygen consumption in the foraging honeybee depends on the reward rate at the food source. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **167**, 36–42.
- Monceau K, Bonnard O, Thiéry D, 2014. Vespa velutina: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal* of Pest Science 87, 1–16.
- Mondière R, Benfatti F, 2016. Pyrethroid Esters for the Control of Insect Pests. In: Lamberth C,, Dinges J, eds. *Bioactive Carboxylic Compound Classes: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 453–466.
- Montoya-Pfeiffer PM, Rodrigues RR, Metzger JP, da Silva CI, Santos Baquero O, Alves dos Santos I, 2018. Are the assemblages of tree pollination modes being recovered by tropical forest restoration? (G Overbeck, Ed,). *Applied Vegetation Science* **21**, 156–163.
- Morales M, Gómez Ramos MJ, Parrilla Vázquez P *et al.*, 2020. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. *Science of The Total Environment* **710**, 136288.
- Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL, 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees (G Smagghe, Ed,). *PLoS One* **7**, e36393.
- Moritz RFA, Härtel S, Neumann P, 2005. Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Écoscience* **12**, 289–301.
- Morrissey BJ, Helgason T, Poppinga L, Fünfhaus A, Genersch E, Budge GE, 2015. Biogeography of *P aenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood, using a new multilocus sequence typing scheme: MLST scheme for *Paenibacillus larvae*. Environmental Microbiology **17**, 1414–1424.
- Motta EVS, Raymann K, Moran NA, 2018. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 10305–10310.
- Mullin CA, 2015. Effects of 'inactive' ingredients on bees. Current Opinion in Insect Science 10, 194–200.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL *et al.*, 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health (F Marion-Poll, Ed,). *PLoS One* **5**, e9754.
- Naggar YA, Baer B, 2019. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). Scientific Reports **9**, 1–11.
- Nakjang S, Williams TA, Heinz E *et al.*, 2013. Reduction and Expansion in Microsporidian Genome Evolution: New Insights from Comparative Genomics. *Genome Biology and Evolution* **5**, 2285–2303.
- Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Salgado VL, Yeh JZ, 2010. Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **97**, 149–152.
- Naug D, 2014. Infected honeybee foragers incur a higher loss in efficiency than in the rate of energetic gain. *Biology Letters* **10**, 20140731.
- Naug D, Gibbs A, 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* **40**, 595–599.
- Nazzi F, Brown SP, Annoscia D *et al.*, 2012. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies (DS Schneider, Ed,). *PLoS Pathogens* **8**, e1002735.
- Nazzi F, Le Conte Y, 2016. Ecology of Varroa destructor, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, Apis mellifera. Annual Review of Entomology 61, 417–432.
- Nazzi F, Pennacchio F, 2018. Honey Bee Antiviral Immune Barriers as Affected by Multiple Stress Factors: A Novel Paradigm to Interpret Colony Health Decline and Collapse. *Viruses* **10**, 159.
- Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. Journal of Apicultural Research 49, 1–6.
- Neumann P, Ellis JD, 2008. The small hive beetle (*Aethina tumida* Murray, Coleoptera: Nitidulidae): distribution, biology and control of an invasive species. *Journal of Apicultural Research* **47**, 181–183.
- Niell S, Jesús F, Pérez N *et al.*, 2017. Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. *Science of The Total Environment* **581–582**, 25–31.
- Nieradko-Iwanicka B, Borzęcki A, 2015. Subacute poisoning of mice with deltamethrin produces memory impairment, reduced locomotor activity, liver damage and changes in blood morphology in the mechanism of oxidative stress. *Pharmacological Reports* **67**, 535–541.
- Oldroyd BP, 1999. Coevolution while you wait: *Varroa* jacobsoni, a new parasite of western honeybees. *Trends* in *Ecology & Evolution* 14, 312–315.
- Ollerton J, 2017. Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 48, 353–376.
- Ollerton J, Winfree R, Tarrant S, 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* **120**, 321–326.
- O'Neal ST, Anderson TD, Wu-Smart JY, 2018. Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 57–62.
- Osborne JL, 2012. Bumblebees and pesticides. Nature 491, 43–45.
- Overstreet RM, 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared hosts. *Aquaculture* **2**, 105–140.
- Özgör E, Keskin N, 2017. Determination of spore longevity and viability of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* according to storage conditions. *The EuroBiotech Journal* **1**, 217–221.

- Paldi N, Glick E, Oliva M *et al.*, 2010. Effective Gene Silencing in a Microsporidian Parasite Associated with Honeybee (*Apis mellifera*) Colony Declines. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 5960–5964.
- Palmquist K, Salatas J, Fairbrother A, 2012. Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology. In: Perveen F, ed. *Insecticides Advances in Integrated Pest Management*. InTech, 251–278.
- Panek J, Paris L, Roriz D et al., 2018. Impact of the microsporidian Nosema ceranae on the gut epithelium renewal of the honeybee, Apis mellifera. Journal of Invertebrate Pathology https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.09.007.
- Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A *et al.*, 2011. Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **8**, 3844–3858.
- Paris L, Peghaire E, Moné A et al., 2020. Honeybee gut microbiota dysbiosis in pesticide/parasite co-exposures is mainly induced by *Nosema ceranae*. Journal of Invertebrate Pathology **172**, 107348.
- Paro S, Imler J-L, 2016. Immunity in Insects. In: *Encyclopedia of Immunobiology*. Elsevier, 454–461.
- Pasteur L, 1870. Études sur la maladie des vers à soie. Paris: La pébrine et la flacherie, Gauthier-Villars.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I, 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**, 558–565.
- Pelin A, Selman M, Aris-Brosou S, Farinelli L, Corradi N, 2015. Genome analyses suggest the presence of polyploidy and recent human-driven expansions in eight global populations of the honeybee pathogen *N osema ceranae*: Genome diversity in the honeybee pathogen *Nosema ceranae*. *Environmental Microbiology* **17**, 4443–4458.
- Perrot T, Gaba S, Roncoroni M, Gautier J-L, Saintilan A, Bretagnolle V, 2019. Experimental quantification of insect pollination on sunflower yield, reconciling plant and field scale estimates. *Basic and Applied Ecology* **34**, 75–84.
- Perry ED, Ciliberto F, Hennessy DA, Moschini G, 2016. Genetically engineered crops and pesticide use in U.S. maize and soybeans. *Science Advances* **2**, e1600850.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA, 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques* **50**, 98–115.
- Pettis JS, Collins AM, Wilbanks Reg, Feldlaufer MarkF, 2004. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **35**, 605–610.
- Peyretaillade E, Parisot N, Polonais V *et al.*, 2012. Annotation of microsporidian genomes using transcriptional signals. *Nature Communications* **3**, 1137.
- Phillips RD, Peakall R, Retter BA *et al.*, 2015. Pollinator rarity as a threat to a plant with a specialized pollination system: Rarity and specialized pollination systems. *Botanical Journal of the Linnean Society* **179**, 511–525.
- Pilling ED, Jepson PC, 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). Pesticide Science **39**, 293–297.
- Pisa L, Goulson D, Yang E-C *et al.*, 2017. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research* https://doi.org/10.1007/s11356-017-0341-3.
- Pistorius J, Bischoff G, Heimbach U, Stähler M, 2009. Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize Hazards of pesticides to bees 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group. *Julius-Kühn-Archiv* **423**, 118–126.
- Pistorius J, Wehner A, Kriszan M *et al.*, 2015. Application of predefined doses of neonicotinoid containing dusts in field trials and acute effects on honey bees. *Bulletin of Insectology* **62**, 161–172.
- Poquet Y, Bodin L, Tchamitchian M *et al.*, 2014. A Pragmatic Approach to Assess the Exposure of the Honey Bee (*Apis mellifera*) When Subjected to Pesticide Spray. *PLOS ONE* **9**, e113728.
- Porrini C, Mutinelli F, Bortolotti L *et al.*, 2016. The Status of Honey Bee Health in Italy: Results from the Nationwide Bee Monitoring Network (JC Nieh, Ed,). *PLOS ONE* **11**, e0155411.
- Porrini MP, Sarlo EG, Medici SK et al., 2011. Nosema ceranae development in Apis mellifera : influence of diet and infective inoculum. Journal of Apicultural Research **50**, 35–41.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010a. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 345–353.
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT et al., 2016. IPBES : Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Bonn: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services.
- Potts SG, Roberts SPM, Dean R et al., 2010b. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. Journal of Apicultural Research 49, 15–22.
- Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, Moran NA, 2014. Routes of Acquisition of the Gut Microbiota of the Honey Bee *Apis mellifera* (H Goodrich-Blair, Ed,). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 7378–7387.
- Ptaszyńska AA, Borsuk G, Mułenko W, Demetraki-Paleolog J, 2014. Differentiation of Nosema apis and Nosema ceranae spores under Scanning Electron Microscopy (SEM). Journal of Apicultural Research **53**, 537–544.
- Quigley TP, Amdam GV, Harwood GH, 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Current Opinion in Insect Science* **35**, 132–137.
- Rader R, Bartomeus I, Garibaldi LA *et al.*, 2016. Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 146–151.

- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delègue M-H, 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* **36**, 601–611.
- Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbronson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, vanEngelsdorp D, 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 1792-1801.
- Rangel J, Gonzalez A, Stoner M, Hatter A, Traver BE, 2018. Genetic diversity and prevalence of *Varroa destructor*, *Nosema apis*, and *N. ceranae* in managed honey bee (*Apis mellifera*) colonies in the Caribbean island of Dominica, West Indies. *Journal of Apicultural Research* **57**, 541–550.
- Rashed MN, El-Haty MTA, Mohamed SM, 2009. Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. *Toxicological & Environmental Chemistry* **91**, 389–403.
- Ravoet J, Maharramov J, Meeus I *et al.*, 2013. Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals Crithidia mellificae as a New Contributory Factor to Winter Mortality (Y Li, Ed,). *PLoS ONE* **8**, e72443.
- Raymann K, Motta EVS, Girard C, Riddington IM, Dinser JA, Moran NA, 2018. Imidacloprid decreases honey bee survival but does not affect the gut microbiome. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, e00545-18.
- Raymann K, Shaffer Z, Moran NA, 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees (J Gore, Ed,). *PLOS Biology* **15**, e2001861.
- Rehman H, Aziz AT, Saggu S, Abbas ZK, Mohan A, Ansari AA, 2014. Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **2**, 1–6.
- Retschnig G, Neumann P, Williams GR, 2014. Thiacloprid–*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate Pathology* **118**, 18–19.
- Retschnig G, Williams G, Schneeberger A, Neumann P, 2017. Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects* **8**, 20.
- Roat TC, Carvalho SM, Palma MS, Malaspina O, 2017. Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil: Enzymatic assessment of honeybees exposed to fipronil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**, 1652–1660.
- Roat TC, dos Santos-Pinto JRA, dos Santos LD, Santos KS, Malaspina O, Palma MS, 2014. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology* **23**, 1659–1670.
- Roberts KE, Evison SEF, Baer B, Hughes WOH, 2015. The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports* 5, 10982.
- Rortais A, Villemant C, Gargominy O et al., 2009. A New Enemy of Honeybees in Europe: the Asian Hornet, Vespa velutina.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology **103**, S96–S119.
- Roudel M, Aufauvre J, Corbara B, Delbac F, Blot N, 2013. New insights on the genetic diversity of the honeybee parasite *Nosema ceranae* based on *multilocus* sequence analysis. *Parasitology* **140**, 1346–1356.
- Rubanov A, Russell KA, Rothman JA, Nieh JC, McFrederick QS, 2019. Intensity of *Nosema ceranae* infection is associated with specific honey bee gut bacteria and weakly associated with gut microbiome structure. *Scientific Reports* **9**, 3820.
- Rueppell O, Hayworth MK, Ross NP, 2010. Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive: Self-removal in honey bees. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 1538–1546.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC *et al.*, 2011. Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, *Nosema*, and Crithidia (RFA Moritz, Ed,). *PLoS ONE* **6**, e20656.
- Ryu J-H, Kim S-H, Lee H-Y et al., 2008. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensalgut mutualism in *Drosophila*. Science **319**, 777–782.
- Sagastume S, del Águila C, Martín-Hernández R, Higes M, Henriques-Gil N, 2011. Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees: rDNA recombination in the microsporidian *Nosema ceranae*. *Environmental Microbiology* **13**, 84–95.
- Sahai-Hernandez P, Castanieto A, Nystul TG, 2012. *Drosophila* models of epithelial stem cells and their niches: *Drosophila* models of epithelial stem cells. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **1**, 447–457.
- Sakamoto Y, Maeda T, Yoshiyama M, Pettis JS, 2017. Differential susceptibility to the tracheal mite Acarapis woodi between *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Apidologie* **48**, 150–158.
- Samson-Robert O, Labrie G, Chagnon M, Fournier V, 2014. Neonicotinoid-Contaminated Puddles of Water Represent a Risk of Intoxication for Honey Bees (JP Meador, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e108443.
- Sanchez-Bayo F, Goka K, 2014. Pesticide Residues and Bees A Risk Assessment (RNC Guedes, Ed,). *PLoS ONE* 9, e94482.
- Sandrock C, Tanadini M, Tanadini LG, Fauser-Misslin A, Potts SG, Neumann P, 2014. Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure (N Desneux, Ed,). *PLoS ONE* 9, e103592.

- Schäfer MO, Ritter W, Pettis J, Neumann P, 2010. Small hive beetles, *Aethina tumida*, are vectors of *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* **41**, 14–20.
- Schmehl DR, Teal PEA, Frazier JL, Grozinger CM, 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **71**, 177–190.
- Schneider CW, Tautz J, Grünewald B, Fuchs S, 2012. RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera* (N Chaline, Ed,). *PLoS ONE* **7**, e30023.
- Schoonvaere K, Smagghe G, Francis F, de Graaf DC, 2018. Study of the Metatranscriptome of Eight Social and Solitary Wild Bee Species Reveals Novel Viruses and Bee Parasites. *Frontiers in Microbiology* **9**, 177.
- Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD, 2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera* : *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **62**, 567–583.
- Schwarz RS, Evans JD, 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental & Comparative Immunology* **40**, 300–310.
- Schwarz RS, Moran NA, Evans JD, 2016. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 9345–9350.
- Seitz N, Traynor KS, Steinhauer N *et al.*, 2015. A national survey of managed honey bee 2014–2015 annual colony losses in the USA. *Journal of Apicultural Research* 54, 292–304.
- Sharma S, Balne PK, Das S, 2014. Ocular Microsporidiosis. In: Weiss LM,, Becnel JJ, eds. *Microsporidia*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., 403–419.
- Sharma A, Kumar V, Shahzad B et al., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences 1, 1446.
- Shepherd S, Lima MAP, Oliveira EE, Sharkh SM, Jackson CW, Newland PL, 2018. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields impair the Cognitive and Motor Abilities of Honey Bees. *Scientific Reports* **8**, 7932.
- Siede R, Faust L, Meixner MD, Maus C, Grünewald B, Büchler R, 2017. Performance of honey bee colonies under a long-lasting dietary exposure to sublethal concentrations of the neonicotinoid insecticide thiacloprid: Testing thiacloprid on bee colonies in a field trial. *Pest Management Science* **73**, 1334–1344.
- Siefert P, Hota R, Ramesh V, Grünewald B, 2020. Chronic within-hive video recordings detect altered nursing behaviour and retarded larval development of neonicotinoid treated honey bees. *Scientific Reports* **10**, 8727.
- da Silva Cruz A, da Silva-Zacarin ECM, Bueno OC, Malaspina O, 2010. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: Morphological alterations in the midgut of A. mellifera. *Cell Biology and Toxicology* **26**, 165–176.
- Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP *et al.*, 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research* **22**, 5–34.
- Sinpoo C, Paxton RJ, Disayathanoowat T, Krongdang S, Chantawannakul P, 2017. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology* **105**, 1–8.
- Škerl S, Gregorc A, 2010. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie* **41**, 73–86.
- Solayman Md, Islam MdA, Paul S *et al.*, 2016. Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review: Minerals and trace elements in honey .... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**, 219–233.
- Soroye P, Newbold T, Kerr J, 2020. Climate change contributes to widespread declines among bumble bees across continents. *Science* **367**, 685–688.
- Sparks TC, Wessels FJ, Lorsbach BA, Nugent BM, Watson GB, 2019. The new age of insecticide discovery-the crop protection industry and the impact of natural products. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **161**, 12–22.
- Stanley J, Sah K, Jain SK, Bhatt JC, Sushil SN, 2015. Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and A. mellifera through laboratory, semi-field and field studies. *Chemosphere* **119**, 668–674.
- Starner K, Goh KS, 2012. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **88**, 316–321.
- Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B et al., 2013. Characteristics of Nosema ceranae infection in Serbian honey bee colonies. Apidologie 44, 522–536.
- Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E *et al.*, 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* **42**, 49–58.
- Strauss U, Human H, Gauthier L, Crewe RM, Dietemann V, Pirk CWW, 2013. Seasonal prevalence of pathogens and parasites in the savannah honeybee (*Apis mellifera* scutellata). *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 45–52.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP, 2004b. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. Pest Management Science **60**, 291–296.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 1901–1905.

- Suchail S, Guez D, Belzunces LP, 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. Environmental Toxicology and Chemistry **20**, 2482–2486.
- Suchail S, Sousa GD, Rahmani R, Belzunces LP, 2004a. *In vivo* distribution and metabolisation of 14C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Management Science* **60**, 1056–1062.
- Szendrei Z, Grafius E, Byrne A, Ziegler A, 2012. Resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science* **68**, 941–946.
- Taillebois E, Cartereau A, Jones AK, Thany SH, 2018. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **151**, 59–66.
- Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM, 2007. Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology* **28**, 829–842.
- Tanner G Development of a method for the analysis of neonicotinoid insecticide residues in honey using LC-MS/MS and investigations of neonicotinoid insecticides in matrices of importance in apiculture. http://othes.univie.ac. at/9119/. Wien.
- Tantillo G, Bottaro M, Di Pinto A, Martella V, Di Pinto P, Terio V, 2015. Virus infections of honeybees Apis mellifera. Italian Journal of Food Safety **4**, 5364.
- Tapparo A, Giorio C, Marzaro M, Marton D, Soldà L, Girolami V, 2011. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 1564.
- Tarpy DR, Mattila HR, Newton ILG, 2015. Development of the Honey Bee Gut Microbiome throughout the Queen-Rearing Process (PD Schloss, Ed,). *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 3182–3191.
- Techer MA, Clémencet J, Simiand C *et al.*, 2017. Large-scale mitochondrial DNA analysis of native honey bee *Apis mellifera* populations reveals a new African subgroup private to the South West Indian Ocean islands. *BMC Genetics* **18**, 53.
- Teixeira A das D, Marques-Araújo S, Zanuncio JC, Serrão JE, 2019. Ultramorphology of the peritrophic matrix in bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Apicultural Research* **58**, 463–468.
- Teixeira EW, Santos LG dos, Sattler A *et al.*, 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **114**, 250–254.
- Tesovnik T, Zorc M, Ristanić M *et al.*, 2020. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. *Environmental Pollution* **256**, 113443.
- Testud F, Grillet J-P, 2007. Insecticides organophosphorés, carbamates, pyréthrinoïdes de synthèse et divers. EMC - Pathologie professionnelle et de l'environnement **2**, 1–24.
- Texier C, Vidau C, Viguès B, El Alaoui H, Delbac F, 2010. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 443–449.
- Thompson HM, 2003. Behavioural Effects of Pesticides in Bees Their Potential for Use in Risk Assessment. *Ecotoxicology* **12**, 317–330.
- Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S, 2014. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* **45**, 545–553.
- Tison L, Hahn M-L, Holtz S et al., 2016. Honey Bees' Behavior Is Impaired by Chronic Exposure to the Neonicotinoid Thiacloprid in the Field. Environmental Science & Technology 50, 7218–7227.
- Tomé HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC, 2015. Spinosad in the native stingless bee Melipona quadrifasciata: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere* **124**, 103–109.
- Tomizawa M, Casida JE, 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology* **48**, 339–364.
- Toplak I, Jamnikar Ciglenečki U, Aronstein K, Gregorc A, 2013. Chronic Bee Paralysis Virus and Nosema ceranae Experimental Co-Infection of Winter Honey Bee Workers (*Apis mellifera* L.). Viruses **5**, 2282–2297.
- Tosi S, Burgio G, Nieh JC, 2017. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Scientific Reports* 7, 1201.
- Tosi S, Nieh JC, 2019. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto <sup>°</sup>), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20190433.
- Toth AL, 2005. Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology* **208**, 4641–4649.
- Traver BE, Fell RD, 2015. A scientific note: Survey for Nosema spp. in preserved Apis spp. Apidologie 46, 194–196.
- Traver BE, Williams MR, Fell RD, 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema* ceranae in honey bee colonies. Journal of Invertebrate Pathology **109**, 187–193.
- Traynor KS, Pettis JS, Tarpy DR *et al.*, 2016. In-hive Pesticide Exposome: Assessing risks to migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern United States. *Scientific Reports* **6**, 33207.
- Tritschler M, Retschnig G, Yañez O, Williams GR, Neumann P, 2017. Host sharing by the honey bee parasites Lotmaria passim and Nosema ceranae. Ecology and Evolution 7, 1850–1857.
- Van Der Valk H, Koomen I, Nocelli RCF *et al.*, 2012. Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents. *Julius-Kühn-Archiv* **437**, 142–158.
- Van Esch L, De Kok J-L, Janssen L *et al.*, 2020. Multivariate Landscape Analysis of Honey Bee Winter Mortality in Wallonia, Belgium. *Environmental Modeling & Assessment* **25**, 441–452.

- Vandame R, Belzunces LP, 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. *Neuroscience Letters* **251**, 57–60.
- Vandame R, Meled M, Colin M-E, Belzunces LP, 1995. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. Exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 855–860.
- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C et al., 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study (J Brown, Ed,). PLoS ONE 4, e6481.
- vanEngelsdorp D, Hayes J, Underwood RM, Pettis J, 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008 (N Gay, Ed,). *PLoS ONE* **3**, e4071.
- vanEngelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S80–S95.
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I et al., 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees (N Ahmed, Ed,). PLoS One 7, e33188.
- Vávra J, Lukeš J, 2013. Microsporidia and 'The Art of Living Together.' In: Advances in Parasitology. Elsevier, 253– 319.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J et al., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae. PLoS One 6, e21550.
- Villa JD, Bourgeois AL, Danka RG, 2013. Negative evidence for effects of genetic origin of bees on *Nosema ceranae*, positive evidence for effects of *Nosema ceranae* on bees. *Apidologie* **44**, 511–518.
- Villatte F, Ziliani P, Marcel V, Menozzi P, Fournier D, 2000. A High Number of Mutations in Insect Acetylcholinesterase May Provide Insecticide Resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **67**, 95–102.
- Villemant C, Haxaire J, Streito C, 2006. Premier bilan de l'invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). *Bulletin de la Société entomologique de France* **111**, 535–538.
- Vivarès C, 1999. Les microsporidies : un regain d'intérêt pour ces curieux parasites. Année Biologique 38, 1–16.
- Wadi L, Reinke AW, 2020. Evolution of microsporidia: An extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites (LI Knoll, Ed,). *PLoS Pathogens* **16**, e1008276.
- Walderdorff L, Laval-Gilly P, Bonnefoy A, Falla-Angel J, 2018. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (lippopolysacharide) of Escherichia coli. *Journal of Insect Physiology* **108**, 17–24.
- Wang Q, Diao Q, Dai P *et al.*, 2016. Exploring poisonous mechanism of honeybee, *Apis mellifera* ligustica Spinola, caused by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **135**, 1–8.
- Wang H, Liu C, Liu Z, Wang Y, Ma L, Xu B, 2020. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. *BMC Microbiology* **20**, 61.
- Warmke JW, Reenan RAG, Wang P *et al.*, 1997. Functional Expression of Drosophila para Sodium Channels Modulation by the Membrane Protein TipE and Toxin Pharmacology. *Journal of General Physiology* **110**, 119–133.
- Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL, 1994. Human Microsporidial Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 426–461.
- Weick J, Thorn RS, 2002. Effects of Acute Sublethal Exposure to Coumaphos or Diazinon on Acquisition and Discrimination of Odor Stimuli in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **95**, 227–236.
- Weiss L, Becnel J, 2014. Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition. Ames, Iowa: Wiley Blackwell.
- White GF, 1913. Sacbrood, a Disease of Bees. Washington, DC: US Department of Agriculture, Bureau of Entomology.
- Whitehorn PR, Wallace C, Vallejo-Marin M, 2017. Neonicotinoid pesticide limits improvement in buzz pollination by bumblebees. *Scientific Reports* **7**, 15562.
- Wiley NC, Dinan TG, Ross RP, Stanton C, Clarke G, Cryan JF, 2017. The microbiota-gut-brain axis as a key regulator of neural function and the stress response: Implications for human and animal health. *Journal of Animal Science* **95**, 3225.
- Williams BAP, Hirt RP, Lucocq JM, Embley TM, 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian Trachipleistophora hominis. *Nature* **418**, 865–869.
- Williams BA, Lee RC, Becnel JJ, Weiss LM, Fast NM, Keeling PJ, 2008. Genome sequence surveys of Brachiola algerae and Edhazardia aedis reveal microsporidia with low gene densities. *BMC Genomics* **9**, 200.
- Williams GR, Shutler D, Burgher-MacLellan KL, Rogers REL, 2014. Infra-Population and -Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts (O Rueppell, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e99465.
- Williams GR, Troxler A, Retschnig G et al., 2015. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. Scientific Reports 5, 14621.
- Williamson SM, Moffat C, Gomersall MAE, Saranzewa N, Connolly CN, Wright GA, 2013. Exposure to Acetylcholinesterase Inhibitors Alters the Physiology and Motor Function of Honeybees. *Frontiers in Physiology* **4**, 1–10.
- Williamson SM, Wright GA, 2013. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology* **216**, 1799–1807.

- Wilson EO, 1971. The Insect Societies. Cambridge, MA.
- Winston ML, 1987. The Biology of the Honey Bee. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Wolf S, McMahon DP, Lim KS *et al.*, 2014. So Near and Yet So Far: Harmonic Radar Reveals Reduced Homing Ability of *Nosema* Infected Honeybees (NE Raine, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e103989.
- Wood SC, Kozii IV, Koziy RV, Epp T, Simko E, 2018. Comparative chronic toxicity of three neonicotinoids on New Zealand packaged honey bees (W Blenau, Ed,). *PLOS ONE* **13**, e0190517.
- Wu Y-Y, Luo Q-H, Hou C-S *et al.*, 2017. Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee *Apis mellifera* L. *Scientific Reports* **7**, 15943.
- Wu-Smart J, Spivak M, 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports* **6**, 32108.
- Xia X, Sun B, Gurr GM, Vasseur L, Xue M, You M, 2018. Gut microbiota mediate insecticide resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). *Frontiers in Microbiology* **9**, 25.
- Xia X, Zheng D, Zhong H *et al.*, 2013. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance (M Ghanim, Ed,). *PLoS One* **8**, e68852.
- Xu P, Shi M, Chen X, 2009. Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana* (FM Ausubel, Ed,). *PLoS ONE* **4**, e4239.
- Xu J, Strange JP, Welker DL, James RR, 2013. Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, Bombus huntii (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics* **14**, 874.
- Yang X, Cox-Foster D, 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* **134**, 405.
- Yao J, Zhu YC, Adamczyk J, 2018. Responses of Honey Bees to Lethal and Sublethal Doses of Formulated Clothianidin Alone and Mixtures. *Journal of Economic Entomology* **111**, 1517–1525.
- Yoshiyama M, Wu M, Sugimura Y, Takaya N, Kimoto-Nira H, Suzuki C, 2013. Inhibition of Paenibacillus larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of Invertebrate Pathology* **112**, 62–67.
- Zaluski R, Justulin LA, Orsi R de O, 2017. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). Scientific Reports **7**, 15217.
- Zander E, 1909. Tierische parasiten als krankenheitserreger bei der biene. Münchener Bienenztg 31, 196–204.
- Zhang X, He SY, Evans JD, Pettis JS, Yin GF, Chen YP, 2012. New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 156–159.
- Zhang ZY, Li Z, Huang Q *et al.*, 2020. Deltamethrin Impairs Honeybees (*Apis mellifera*) Dancing Communication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **78**, 117–123.
- Zheng H-Q, Gong H-R, Huang S-K, Sohr A, Hu F-L, Chen YP, 2015. Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Veterinary Microbiology* **177**, 1–6.
- Zhou T, Zhou W, Wang Q et al., 2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees Apis mellifera. Pesticide Biochemistry and Physiology **100**, 35–40.
- Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL, 2014. Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae (W Blenau, Ed,). *PLoS ONE* **9**, e77547.

# ANNEXE



# G OPEN ACCESS

**Citation:** Blot N, Veillat L, Rouzé R, Delatte H (2019) Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. PLoS ONE 14 (4): e0215466. https://doi.org/10.1371/journal. pone.0215466

**Editor:** Olav Rueppell, University of North Carolina at Greensboro, UNITED STATES

Received: October 28, 2018

Accepted: April 2, 2019

Published: April 16, 2019

**Copyright:** © 2019 Blot et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** The project was funded by the CNRS EC2C0 (ECosphère COntinentale et COtière) CALAMITI project (NB) and by the ANR (Agence Nationale de la Recherche) MIXTRESS project (ANR-15-CE34-0004) (LV, RR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. RESEARCH ARTICLE

# Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota

#### Nicolas Blot<sup>1\*</sup>, Loïs Veillat<sup>1</sup>, Régis Rouzé<sup>1</sup>, Hélène Delatte<sup>2</sup>

1 Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement", Clermont–Ferrand, France, 2 CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical, Pôle de Protection des Plantes, Saint-Pierre, France

\* nicolas.blot@uca.fr

## Abstract

The honeybee (Apis mellifera) has to cope with multiple environmental stressors, especially pesticides. Among those, the herbicide glyphosate and its main metabolite, the aminomethylphosphonic acid (AMPA), are among the most abundant and ubiquitous contaminant in the environment. Through the foraging and storing of contaminated resources, honeybees are exposed to these xenobiotics. As ingested glyphosate and AMPA are directly in contact with the honeybee gut microbiota, we used guantitative PCR to test whether they could induce significant changes in the relative abundance of the major gut bacterial taxa. Glyphosate induced a strong decrease in Snodgrassella alvi, a partial decrease of a Gilliamella apicola and an increase in Lactobacillus spp. abundances. In vitro, glyphosate reduced the growth of S. alvi and G. apicola but not Lactobacillus kunkeei. Although being no bee killer, we confirmed that glyphosate can have sublethal effects on the honeybee microbiota. To test whether such imbalanced microbiota could favor pathogen development, honeybees were exposed to glyphosate and to spores of the intestinal parasite Nosema ceranae. Glyphosate did not significantly enhance the effect of the parasite infection. Concerning AMPA, while it could reduce the growth of G. apicola in vitro, it did not induce any significant change in the honeybee microbiota, suggesting that glyphosate is the active component modifying the gut communities.

#### Introduction

Glyphosate, or N-(phosphonomethyl)glycine, is as a broad-spectrum herbicide used for weed control. It blocks the plant growth by inhibiting the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), an enzyme of the shikimate pathway involved in the synthesis of aromatic metabolites, including aromatic amino acids [1,2]. The EPSPS is present in plants but also in bacteria and fungi, but not in metazoans. Glyphosate is the most sprayed herbicide worldwide, especially under commercial formulations, the best known being Roundup. The frequency and intensity of glyphosate application as well as the surface of treated croplands have been growing constantly, especially since the marketing of Genetically Engineered Herbicide-Tolerant (GE-HT) crops. The wide use of the herbicide has for consequence the contamination of

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

the environment by glyphosate and its metabolites, the most abundant being the aminomethylphosphonic acid (AMPA). AMPA is mainly produced from glyphosate metabolization by soil and saprophyte microorganisms and by second generation of GE-HT plants, but also from other human activities [3–5]. AMPA is more persistent than glyphosate in the environment. Glyphosate and AMPA can be found in all treated plant products but also in non-target plants, in the soil, in surface and groundwaters and even in the atmosphere [2,3]. Since glyphosate and AMPA contaminate water and plant matrices, they can be ingested by animal consumers. For instance, by foraging contaminated pollen, nectar and water, pollinators are exposed to glyphosate and its metabolites.

The European honeybee, *Apis mellifera*, is the most commonly managed pollinator. It is the main pollinator of major crops and thus offers tremendous economic and ecosystem services [6,7]. Honeybees are exposed to a variety of environmental stressors. Among them, pesticides have been suspected to be partly responsible for the colony losses observed worldwide. By gathering resources honeybee foragers bring back to the colony contaminated materials and the entire colony is then chronically exposed to pesticides [8]. Glyphosate has been detected in various hive matrices, including pollen, nectar, honey and honeybee larvae [9–13]. However few data are available concerning the effect of such exposure to glyphosate on the honeybee, and none concerning AMPA.

Despite its low toxicity to arthropods, glyphosate residues may have sublethal effects and affect their fitness [14–18]. In the honeybee, glyphosate or Roundup formulation can induce an increase in lipid peroxidation, a decrease in  $\beta$ -carotene and derived antioxidants, and a reduction in acetylcholine esterase activity [13,19–21]. A chronic exposure to the herbicide can reduce the honeybee learning performance while acute exposure was shown to reduce its short-term memory [22,23]. Glyphosate can also affect the honeybee navigation by increasing the time and path of homeward flight [24]. Nothing is known concerning AMPA, whose toxicity was shown to be low on another arthropod, the crustacean *Daphnia magna* [4].

Once ingested by consumers, glyphosate and AMPA are in contact with the microbial communities of their gut. While glyphosate is known to affect the soil and aquatic microbial communities, its effects on animal gut communities is beginning to gain attention [3]. Indeed glyphosate residues can disturb the gut microbiota of mammals and reptilians and this dysbiosis could partly be due to the variable capacity of bacteria to proliferate in the presence of glyphosate [25–29]. In the honeybee, the impact of a long-term exposure to glyphosate has recently been initiated. In the midgut of emerging honeybees reared *in vitro*, the bacterial beta-diversity was reduced and the abundance of bacterial taxa changed when larvae were fed with a diet containing glyphosate [30]. Motta *et al.* [31] showed that glyphosate also affect the microbiota of adult honeybee workers in the USA. The present work similarly aimed to assess the effect of glyphosate, but also of its main metabolite AMPA, on the installed gut microbial communities of adult honeybee workers in Europe. We thus discussed the results obtained in both studies.

The adult honeybee gut is colonized by microbial communities, almost exclusively bacteria, within the first week following the emergence of the imago [32,33]. The core microbiota, that is common between workers, is relatively stable and simple. It is composed of five major bacterial taxa that are *Lactobacillus* Firm-4 and *Lactobacillus* Firm-5, the gammaproteobacter-ium *Gilliamella apicola*, the betaproteobacterium *Snodgrasella alvi* and *Bifidobacterium* spp. related to the *Bifidobacterium asteroides* cluster. Among minor taxa, Alphaproteobacteria are the most abundant. We used Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR) to compare the abundance of these bacterial taxa in response to glyphosate and to AMPA. Bacterial strains were also isolated from honeybee guts to test whether their growth was sensitive to those contaminants.

#### Materials and methods

#### Honeybees artificial rearing

Experiments were performed on interior workers collected on brood frames from five colonies of the same apiary in Clermont-Ferrand, France. All colonies came from *A. mellifera ligustica* Buckfast nuclei (Paul Jungels strain, Naturapi [34]). Each of the five colonies represented an independent replicate. Workers were divided into cohorts of 70 individuals in cages, incubated and fed with sugar syrup, as described elsewhere [35]. In treated conditions, the syrup was supplemented with pure glyphosate (Interchim SS-7701) and/or AMPA (Sigma-Aldrich 324817).

A first experiment was performed on overwintering honeybees (February 2018) that were submitted to (i) no treatment, (ii) a chronic exposure to 1.5 mM glyphosate in their sugar syrup (or 0.21 g/kg according to syrup density), (iii) an infection with spores of the parasite *Nosema. ceranae*, (iv) an infection by *N. ceranae* and a chronic exposure to 1.5 mM glyphosate. Chronic exposure to herbicides was performed by feeding honeybees *ad libitum* with sugar syrup containing pesticides. The absence of *N. ceranae* and *Nosema apis* in the colonies was checked by PCR [35] on 20 honeybees before experiment initiation. *N. ceranae* infection was performed one day before experiment initiation, by collectively infecting cohorts of 70 honeybees with a mean of 150 000 spores of the parasite per bee in 2.5 mL of syrup until complete consumption. *N. ceranae* spores were obtained according to Vidau *et al.* [36]. Dead bees were removed daily. Feeders were replaced and weighed daily to measure sucrose consumption [35].

The surprisingly strong effect observed on the microbiota by glyphosate led us to repeat the experiment on cohorts of summer honeybees (June 2018) from the same five colonies, but with more concentrations and contaminants: (i) no treatment and chronic exposures to (ii) 1.5 mM (0.21 g/kg) glyphosate, (iii) 7.5 mM (1.08 g/kg) glyphosate, (iv) 1.5 mM (0.14 g/kg) AMPA, (v) 7.5 mM (0.70 g/kg) AMPA, (vi) 1.5 mM glyphosate and 1.5 mM AMPA, (vii) 7.5 mM glyphosate and 7.5 mM AMPA. The chosen concentrations of glyphosate are above most of the ones measured in hives matrices in other studies [9–13]. However they are related to the mean concentrations found in foraged pollen one day (0.47 g/kg) and four days (0.16 g/kg) following an experimental semi-field treatment [11]. Our experiments would thus be related to an unusually persistent exposure to glyphosate.

#### Gut DNA purification and PCR quantification of bacterial taxa

Honeybees were sacrificed 15 days after the experiment initiation. The presence or absence of *Nosema* spores in individuals was checked by microscopy (x400). For each experimental condition and replicate, the full digestive tracts of 8 honeybees were dissected on ice, pooled and stored at -80°C. The total DNA of pooled guts was purified as described in Engel *et al.* [37]. QPCR analyses were performed using the primers referenced in <u>S1 Table</u>. All primer pairs targeted the small subunit (SSU) ribosomal RNA encoding gene but allowed the quantification of specific bacterial taxa that were *Bifidobacterium* spp., all *Lactobacillus* spp. or *Lactobacillus* Firm-5 clade only, *S. alvi* (two pairs: Neiss-F/Neiss-R and Beta-1009-qtF/Beta-1115-qtR), *G. apicola* (two pairs: Gamma1-459-qtF/Gamma1-648-qtR and Gill-F/Gill-R), Alphaproteobacteria, and the whole Bacteria taxon (two pairs: 341F/534R and BAC338F/BAC805R). QPCR reactions were performed in a final volume of 20 µL containing 0.5 volume of 2X Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific), 10 pmol of each primer and 5 to 25 ng of total genomic DNA. Negative controls (water) were included in each set of reactions. Treated and untreated samples from a same replicate were always deposited on the same plate and all plates were duplicated. The PCR conditions (CFX96 Real-Time System Thermocycler,

BioRad) were 1 cycle at 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of 25 s at 94°C, 25 s at 53°C and 25 s at 72°C. Specificity of reactions was checked by analyzing the melting curves of the amplified products. In order to avoid biases due to non-bacterial DNA (*e.g.* from the host or the parasite), QPCR data were normalized to the total bacterial DNA content estimated by the mean of the Cycle Quantification (CQ) obtained with 341F/534R and BAC338F/BAC805R primer pairs. The log2 of the ratio of a taxonomic group in a treated condition relative to the untreated one were obtained by subtracting the normalized CQ of control from the normalized CQ of the treated sample at the corresponding season and sampling day. Statistical analyses were performed using PAST software [38]. Non-normal data gave no significant difference using paired Wilcoxon signed rank or Mann & Whitney tests. Paired t-test was performed for normal data and differences were considered significant for *p*-values below 0.05. When a difference was significant, a similar positive or negative effect was observed in all of the five colony replicates.

#### Isolation and growth of gut bacterial strains

Single guts from nine interior honeybees were dissected and homogenized in 800  $\mu$ L of 1X Phosphate-Buffered Saline. After serial dilutions, samples were plated onto Heart Infusion Broth (HIB) medium and MRS medium supplemented with fructose and cysteine [37] and incubated for 48 h at 34°C under low O<sub>2</sub> and >9% CO<sub>2</sub> atmosphere using Oxoid AnaeroGen sachets (Thermo Scientific). Colonies were picked up and isolated onto the same medium several times until axenic liquid cultures were obtained, as verified by replating and microscopic observation of Gram-stained bacteria. Thirteen strains were isolated and their genomic DNA was extracted. Their SSU encoding gene was amplified with the Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) using a 1:1:2 mix of primers 27f-YM, 27f-Bif and 1492r (<u>S1 Table</u>). The amplification products were cloned into pGEM-T Vector (Promega). Following transformation and blue/white screening, colonies were cultured and their DNA extracted. The amplicon sequences were obtained using T7 and M13 primers (Eurofins Genomics) and deposited, after the trimming of vector and primer sequences, in GenBank database (accessions MH782109 to MH782121).

Cultures of seven selected isolates were diluted 50 times in fresh HIB medium, but supplemented MRS medium for *Lactobacillus* strains (S2 Table). 750  $\mu$ L of the dilution were deposited in wells of a 24-well plate containing various quantities of glyphosate and AMPA. Six independent cultures were performed for each herbicide concentration. After 48h of incubation as above, the optical density (OD) of the cultures were measured at 600 nm, using sterile medium as a blank. For statistical analyses [<u>38</u>], Student t-test was performed for normal data otherwise the Mann & Whitney test was performed. Differences were considered significant for *p*-values below 0.05

#### Results

Interior overwintering honeybee workers were exposed to 1.5 mM of glyphosate in their feeding *ad. lib.*, to spores of the parasite *N. ceranae*, or to both stressors. To verify the effect of glyphosate on the microbiota, a second experiment was performed on summer honeybees that were chronically exposed to 1.5 mM and 7.5 mM of glyphosate, of AMPA and of stoichiometric mixtures of both xenobiotics.

#### Glyphosate and AMPA were not lethal and did not alter food consumption

Survival analyses demonstrated that glyphosate but also AMPA, alone or together, did not induce any significant decrease in honeybee survival, compared to control, whatever the

season (S1 Fig). In contrast a significant decrease of survival was observed in *Nosema*-infected bees as previously observed [39]. No synergistic effect was observed between glyphosate and *N. ceranae* or between glyphosate and AMPA. The constant decrease on survival in summer could be associated with the shorter lifespan of honeybees during the beekeeping season [40]. The data confirmed previous studies showing that glyphosate is no bee killer [11,13,19,21–23] and showed that it is also true for AMPA. Thus, whatever the observed effects on the microbiota, they ought to be sublethal.

A decrease in food consumption by glyphosate-treated honeybees was suggested but not always observed in previous studies [21,23]. Here, the daily sugar consumption was affected neither by glyphosate, nor AMPA, nor *N. ceranae* (S2 Fig). The daily mean consumption of glyphosate and AMPA were between 49.2 and 57.4 nmol.d<sup>-1</sup>.bee<sup>-1</sup> and between 245 and 264 nmol.d<sup>-1</sup>.bee<sup>-1</sup> for exposures at 1.5 mM and 7.5 mM respectively. The oral and topic LD50 of glyphosate are far greater than 0.1 mg of active ingredient per bee. Zhu *et al.* [41] estimated the topic LD50 as  $3.5 \times 10^{31} \mu g$ /bee, *i.e.* about half the mass of the moon of glyphosate per bee. The daily and cumulative consumptions of glyphosate were thus clearly far below lethality.

**Glyphosate, but not AMPA, altered the abundance of the major honeybee gut bacteria.** The honeybee gut microbiota can be altered by fungicides and acaricides [42]. We tested whether it can be affected by the herbicide glyphosate or by its metabolite AMPA. The relative abundance of the major bacterial taxa of the microbiota, normalized to the total bacterial DNA, was assessed by QPCR after 15 days of chronic exposure. Two-way ANOVA showed significant interactions neither between season and glyphosate treatment, nor between glyphosate and *N. ceranae*, nor between glyphosate and AMPA. Multivariate analyses suggested that season and glyphosate, but not AMPA were the two most important components explaining the observed variances, with *S. alvi* as the major factor explaining the effect of glyphosate (<u>S3 Fig</u>).

Indeed a very strong and significant decrease of *S. alvi* was observed in response to glyphosate, with 5 to 13 times less *S. alvi* in treated samples than in untreated controls (Fig1). This decrease was independent of the applied dose, the season and the QPCR primer pair. Other major taxa of the microbiota were less affected by glyphosate. The relative abundance of *G. apicola* was significantly decreased in the presence of glyphosate using Gill-F/Gill-R but not G1-459-qtF/G1-648-qtR primers. A significant increase of all *Lactobacillus* spp. and of *Lactobacillus* Firm-5 only was observed in response to 7.5 mM but not to 1.5 mM glyphosate. The data cannot determine if all *Lactobacillus* spp. are affected or if their global increase is due to the sole Firm-5 clade. At last *Bifidobacterium* spp. and Alphaproteobacteria were not affected.

In contrast to glyphosate, AMPA alone had no significant effect on any bacterial taxa and no interaction between the two molecules was observed following co-exposure.

#### Glyphosate did not potentiate Nosema ceranae infection

To test whether a glyphosate exposure could increase the effect of an infection by the intestinal parasite *N. ceranae*, overwintering honeybees were co-exposed to spores of the parasite and to glyphosate. No stronger effect was observed on mortality (S1 Fig), sugar consumption (S2 Fig) and bacterial abundances (Fig 1) when both the parasite and the herbicide were applied.

# Glyphosate and AMPA can directly affect the growth of honeybee gut bacteria

In order to test whether honeybee gut bacteria were sensitive to glyphosate and AMPA, strains were isolated from the guts of nine untreated honeybees. Thirteen strains were isolated and identified by the cloning and sequencing of their SSU RNA encoding gene (S2 Table). All obtained sequences were related to known sequences of the honeybee microbiota [43]. Strains



Fig 1. Abundances of the main bacterial taxa of the honeybee microbiota after chronic exposure to glyphosate and/or AMPA, relative to untreated controls. Summer and winter honeybees were chronically exposed to 1.5 mM or 7.5 mM of glyphosate (GLY) and/or AMPA in their feeding sugar syrup. Some bees were also infected with spores of *N. ceranae* (Ncer). Control bees (Ct) were not exposed to any stressor. 15 days after treatment initiation, the DNA from guts was extracted and the 16S rDNA of the major taxa of the microbiota was quantified by QPCR and normalized to the total bacterial 16S content. The data are represented as the log2 of the ratio of the abundance in treated condition relative to untreated controls. Data were gathered from five independent colony-replicates. Bars represent the 95% confidence intervals. Stars and hash marks indicate significant differences (paired t-test, p<0.05 and p<0.005 respectively). When a difference was significant, a similar effect was observed in all the five colony replicates.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466.g001

belonging to the core gut microbiota taxa were isolated, including *G. apicola*, *S. alvi*, *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp.. Neither a *Lactobacillus* Firm-4 nor a *Lactobacillus* Firm-5 strain was isolated but two *Lactobacillus kunkeei* strains. Although the Firm-4 and Firm-5 clades are dominant in the microbiota, *L. kunkeei* is known to be the most easily recovered



**Fig 2. Growth of bacterial strains isolated from the honeybee gut in the presence of glyphosate and AMPA.** Strains were inoculated in HIB or MRS medium in the presence of increasing concentrations of glyphosate (GLY) or AMPA. After 48h of growth under anaerobic conditions, the optical density of the cultures was measured at 600 nm. The results are presented as the mean ratio between treated culture and control culture without xenobiotic that was used as a calibrator. Data were gathered from six independent replicates. Bars represent the 95% confidence intervals. A significant difference (Student t-test or Mann-Whitney test) is indicated by a star (p<0.05) or a hash mark (p<0.001).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466.g002

*Lactobacillus* species in cultures [<u>37</u>]. Strains from rare taxa, belonging to the genera *Staphylococcus*, *Hafnia* and *Lysinibacillus*, were also isolated. Seven strains were selected to test the sensitivity of their growth in the presence of increasing concentrations of glyphosate and AMPA (Fig 2).

The growth of *S. alvi* was very significantly reduced in the presence of glyphosate but not in the presence of AMPA. Moreover the impairment of *S. alvi* growth seemed dose-dependent

(S4 Fig). The isolated strain of *G. apicola* was also sensitive to glyphosate, to a lesser extent. The growth of *G. apicola* was also significantly reduced in the presence of AMPA, and completely impaired in the presence of 5 mM AMPA. The *Bifidobacterium* sp. strain was also sensitive to glyphosate but not to AMPA. In contrast the isolated strains of *Lactobacillus*, and *Staphylococcus* were more resistant to the herbicide and its metabolite.

#### Discussion

The present study confirmed the work of Motta *et al.* [31] by showing that glyphosate, although not lethal for the honeybee, can alter its gut microbiota. In relative abundance, a strong decrease in of *S. alvi* and an increase in *Lactobacillus* spp. were observed in response to glyphosate (Fig 1), which was consistent with the data of Motta *et al.* [31] in newly emerged and interior bees. In contrast, opposite results were observed on *G. apicola.* In absolute abundance, Motta *et al.* [31] showed that glyphosate induced a reduction in the total bacterial content of the honeybee gut microbiota, as well as a decrease in *S. alvi, Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp..

# Glyphosate altered the microbiota by impairing the growth of some gut bacteria

The growth of axenic cultures *in vitro* showed that glyphosate reduced the generation time of *S. alvi* and *G. apicola* [31] as well as the biomass production of *S. alvi* and *G. apicola* and *Bifidobacterium* sp. (Fig 2, [31]). In contrast, the growth of *Lactobacillus* and other Firmicutes strains, including *Staphylococcus* and *Lysinibacillus* (Fig 2), as well as *Bartonella apis* [31] was not altered by glyphosate. These differences may be related to the sensitivities of the EPSPS, the enzyme that is inhibited by glyphosate. Three classes of EPSPS have been characterized by experimental, structural and molecular analyses [44]. The presence of conserved amino acids and the phylogenetic analyses of EPSPS showed that the enzymes of *S. alvi*, *G. apicola* and *Bifidobacterium* spp. belong to the glyphosate-resistant Class II (S5 Fig). The sensitivity of *S. alvi*, *G. apicola* and *Lactobacillus* spp. EPSPS was confirmed by gene complementation in *E. coli* [31]. Altogether, these data strongly suggest that glyphosate alters the honeybee gut microbiota by directly affecting the growth of species producing a glyphosate-sensitive EPSPS, especially *S. alvi*.

*G. apicola* may comprise distinct populations with different sensitivities to glyphosate. The relative abundance in *G. apicola* in response to glyphosate showed contrasted results between the partial decrease observed in the present experiment and the increase observed in the study conducted by Motta *et al.* [31]. Interestingly our results differed according to the primer pairs used for quantification. The abundance of *G. apicola* did not change using the G1-459-qtF/G1-648-qtR primers while it decreased using Gill-F/Gill-R (Fig 1). A phylogenetic analysis of *G. apicola* 16S sequences found in *Apis* species showed that the two primer pairs targeted different clades of *G. apicola* strains (S6A Fig). No *G. apicola* sequence derived from *Apis mellifera* microbiota was found within the clades recognized by Gill-F/Gill-R , whereas amplification occurred using these primers. This suggested that the honeybee microbiota caries those targeted strains and that available sequence data do not depict the true diversity of *G. apicola*. *G. apicola* might comprise distinct phylotypes with different susceptibility to glyphosate. The contrasting increase in relative abundance of *G. apicola* observed by Motta *et al.* [31] suggests that the phylotype richness may be even more composite, with variations that might depend on locations, landscape and/or genetic background [45,46]. In response to the herbicide, *G. apicola* would experience a complex rebalancing of its phylotypes content.

The origin of the variation of *G. apicola* sensitivity toward glyphosate should be related to other adaptations than resistance of the EPSPS. Mechanisms of resistance to glyphosate, including the efflux and the enzymatic degradation of the herbicide, have been described in microorganisms isolated from contaminated soils and streams [3,47]. However the presence of genes encoding phosphonate-degrading enzymes or transporters in a genome would not allow any assertion upon glyphosate resistance as the specificity of these proteins toward different phosphonate molecules, including glyphosate, may greatly vary.

Concerning *S. alvi*, the two primer pairs used for quantification gave similar results. This could be explained by their similar specificity, except for one clade that did not comprise taxonomic units from *A. mellifera* anyway (S6B Fig). Motta *et al.* [31] did not mention clades responding differently to glyphosate. Thus, the whole *S. alvi* species could be affected by the herbicide.

# Gut communities may be indirectly affected through ecological niches alteration

As expected, the growth of strains producing a glyphosate-resistant EPSPS were not affected by glyphosate (Fig 2). Glyphosate even induced an increase in the relative abundance of *Lactobacillus* spp. (Fig 1). Similarly, Motta *et al.* [31] observed a reduced absolute abundance of *Lactobacillus* spp. but an increase in relative abundance of *Lactobacillus* Firm-5 in one experiment on interior honeybees and of *Lactobacillus* Firm-4 in one experiment on newly emerged workers. Several not exclusive hypotheses may be proposed to explain this positive impact of the herbicide.

Motta *et al.* [21] suggested that the dependency of *Lactobacillus* spp. for amino acids released by other bacteria, such as *S. alvi*, could explain the absolute negative effect of glyphosate on both species. Such metabolic interactions between gut bacterial species were suggested by genomic data [33]. The microbiota could thus be depicted as a consortium of symbiotic species that faces as a whole its environmental stressors. However experimental data are missing to demonstrate the strength of these interactions.

The observed relative increase in *Lactobacillus* spp. may also be explained by experimental procedures since the use of total bacteria as a reference implies that a relative decrease in some species ought to be balanced by an increase in other taxa. A parallel but ecological hypothesis can be proposed. The reduction of some bacterial species could release ecological niches that would be occupied by others. *S. alvi* is thought to form a layer on the ileum wall, itself covered by a layer of *G. apicola*, whereas *Lactobacillus* spp. are abundant in the lumen [48]. *Lactobacillus* spp. could benefit from changes in this biofilm-like organization in stressed honeybees by occupying the freed space.

Modifications in the microbiota could also be partly due to a global alteration in the gut homeostasis, keeping in mind that this homeostasis is itself regulated by the microbiota. In *Drosophila melanogaster*, a glyphosate-based formulation can induce a reduction in reactive oxygen species (ROS) and an increase in antioxidant defenses, suggesting that the insect has to cope with an oxidative stress [16]. Such stress may occur in the honeybee as higher lipid peroxidation and lower carotenoids content were observed following an exposure to glyphosate [20]. In mammals, glyphosate is also known to induce detoxification systems and to change the pH of intestinal content [49–51]. Bacteria are diversely sensitive to those environmental conditions and such changes in their habitat could differently impact the bacterial taxa of the honeybee gut.

#### Glyphosate may sensitize the honeybee to some but not all pathogens

The gut microbiota is known to protect the host against pathogens through the stimulation of the immune system and the competition for niche occupation  $[\underline{52}-\underline{54}]$ . Thus gut pathogens may opportunistically benefit from the alterations of the microbiota.

It was shown that the suppression of gut bacteria increases the honeybee susceptibility to the intestinal parasite *N. ceranae*, while a supplementation with *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* seemed to affect the reproduction success of the parasite [55-56]. We tested whether glyphosate could potentiate the infection by *N. ceranae*. Glyphosate did not enhance the effect of the parasite on the honeybee mortality (S1 Fig), sugar consumption (S2 Fig) and gut bacterial abundances (Fig 1). This result contrasted with the higher susceptibility of glyphosate-treated honeybees toward an infection with *Serratia marsescens* [31]. The effect of glyphosate on the susceptibility of the honeybee to pathogens may thus depend on several parameters, such as, the type of pathogen, its sensitivity to the immune and detoxification systems, its capacity to compete with the normal gut flora and its sensitivity to glyphosate. Moreover, the sensitivity of the honeybee to pathogens also depends on a variety of stressors and laboratory experiments are themselves stressful conditions [45].

Interestingly glyphosate may alter the growth of bacterial pathogens. *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, the etiological agents of the American foulbrood (AFB) and European foulbrood (EFB) respectively, are bacteria that proliferate within the gut of honeybee larvae [53,54] and their EPSPS belong to the glyphosate-sensitive Class I and to the glyphosate-resistant Class II respectively (S5 Fig). Such differential sensitivity could lead to the odd hypothesis that *M. plutonius* could benefit from an imbalanced gut flora, favoring EFB, and in contrast, that glyphosate could reduce the development of the AFB. Future *in vivo* experiments could tell if glyphosate alters, in one way or another, the virulence of those gut pathogens.

#### AMPA appeared to be no risk for the honeybee

The main metabolite of glyphosate, AMPA, that is more persistent and often more abundant than glyphosate in the environment, did not induce any significant change in the honeybee microbiota (Fig 1), although it can affect the growth of *G. apicola in vitro* (Fig 2). If *G. apicola* would include taxa with different sensitivities to glyphosate, it could be similar with AMPA. It is possible that the sensitive strain isolated in this work is scarce in the honeybee gut.

The mode of action of AMPA remains unclear. It has been suggested that, as a glycine analog, AMPA could inhibit the mammal serine hydroxymethyltransferase, or SHMT [57]. SHMTs are involved in the folate-mediated one-carbon metabolism, and thus in purine bio-synthesis and in the reversible glycine to serine conversion. It has also been proposed that AMPA could act as an alanine analog that would inhibit enzymes involved in peptidoglycan biosynthesis, explaining its antimicrobial properties [58]. Genes encoding all these enzymes are present in the genomes of the species discussed in this work, including *G. apicola*, *S. alvi* and *L. kunkeei*. The comparison of protein sequences with those available in the UniProt database did not allow formulating hypotheses about variation in their sensitivity and the higher sensitivity of *G. apicola* to AMPA may as well be linked to other mechanisms.

The absence of bacterial response to AMPA *in vivo* demonstrated that glyphosate itself is the active component affecting the microbiota. Its degradation to AMPA may contrariwise reduce its effects, although the toxicity of AMPA on the honeybee physiology is unknown. In the environment, glyphosate is mainly degraded into AMPA by soil and saprophyte bacterial and fungal communities [3–5]. Such transformation would be beneficial for the honeybee by reducing the concentration of glyphosate.

#### Conclusion

In the context of honeybee population decline, where combinations of environmental contaminants are suspected, the weakening of honeybee health through the exposure to xenobiotics of low toxicity may be of importance. Glyphosate has sublethal effects on the honeybee gut microbiota, changing the abundance of major bacterial taxa, especially by affecting the growth of *S. alvi*. The consequences of such microbial disturbance are unclear: is the honeybee able to cope with glyphosate and preserve the gut homeostasis or will future data demonstrate that this changes are linked with a functional dysbiosis?

An increasing amount of data proves that the honeybee microbiota takes its part in the response to stressors, showing that the whole holobiont, *i.e.* the honeybee and its microbial communities, should be considered when challenging environmental constraints.

#### Supporting information

S1 Fig. Cumulative proportion of surviving honeybees chronically exposed to glyphosate (A), AMPA (B), stoichiometric mixes of glyphosate and AMPA (C) in summer, or exposed to glyphosate and/or *N. ceranae* in winter (D). Glyphosate (GLY) and aminomethylphosphonic acid (AMPA) were added in the feeding sugar syrup, and spores of *N. ceranae* were orally administrated the day preceding the experiment. Control bees were not exposed to any stressor. Survival proportion was estimated using the Kaplan-Meier method. Thick curves represent the mean values from five colony replicates (n = 5) and the thin curves represent the amplitude of the standard error. Data were considered significant when reproduced in all colony replicates. Only the decrease of survival in infected bees (D) was significant in all colony replicates (Log rank  $\chi^2 > 6.7$  and p < 0.01). (PDF)

S2 Fig. Daily mean sucrose (A) and herbicide (B) consumption of honeybees chronically exposed to glyphosate and/or AMPA in summer or to glyphosate and/or *N. ceranae* in winter. Glyphosate (GLY) and aminomethylphosphonic acid (AMPA) were added in the feeding sugar syrup, and spores of *N. ceranae* were orally administrated the day preceding the experiment. Control bees were not exposed to any stressor. (A) The sugar consumption was measured daily and reported to the number of surviving bees. No significant difference was observed. (B) The mean daily glyphosate (white) and AMPA (grey) uptake was expressed in nmol/bee/d (upper scale) and in µg/bee/d of molecules (lower scales). Bars represent the 95% confidence intervals.

(PDF)

S3 Fig. Principal component analyses of QPCR data (A) for control and 1.5 mM glyphosate-treated samples in summer and winter, and (B) for glyphosate- and AMPA-treated samples in summer. Analyses were performed using the normalized CQ (relative to total bacterial content). In order to avoid redundant data for the same taxa, values obtained using *Lactobacillus* Firm-5 primers as well as Neiss-F/Neiss-R and Gill-F/Gill-R were omitted. Very similar results were obtained exchanging primer pairs data for a same bacterial taxon. Using glyphosate data only on both season (A), PCA analysis showed that 91.6% of the variance were explained by two principal components that seemed mainly linked to the season and to the glyphosate treatment. However, two-ways ANOVA (not shown) did not detect significant interaction between herbicides and season. Using the data in summer (B), PCA revealed that 70.9% of the variance was explained to one single component mostly related to glyphosate treatment, *S. alvi* being the main variable correlated with

the component. (PDF)

S4 Fig. Growth of *S. alvi* strains IHP.IC1 (filled triangles) and IHP.IO2 (open circles) isolated from honeybee guts in the presence of glyphosate. Strains were inoculated in HIB medium in the presence of increasing concentrations of glyphosate. After 48h of growth under anaerobic conditions, the optical density (OD) of the cultures was measured at 600 nm. Data were gathered from six independent replicates. The log of the final OD seemed correlated to the glyphosate concentration (r: correlation coefficient, r<sup>2</sup>: determination coefficient), suggesting a dose-dependent reduction of the *S. alvi* produced biomass by the herbicide. (PDF)

S5 Fig. Phylogenetic analysis (A) and conserved amino acids (B) of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases (EPSPS). (A) amino acid sequences were taken from a previously reported phylogenetic tree [1], and sequences of species phylogenetically related to the isolated strains were selected in GenBank. E. coli MurA sequence was used as an outgroup belonging to the EPSPS family. Sequences were aligned using Muscle and trimmed to 726 sites (amino acids 4 to 419 of V. cholerae reference sequence). Le and Gascuel model with discrete Gamma distribution and allowance for invariant sites (LG+I+G) was selected as best-fit model of protein evolution using ProtTest [2]. The Bayesian phylogenetic tree was inferred using MrBayes V3.2.6 software [3], with branch probabilities evaluated from 865 000 simulations and 15% burn-in. The consensus phylogenetic tree was built by majority greedy clustering with  $\geq 0.5$  support probability. The glyphosate-sensitive Class I $\alpha$  and Class I $\beta$  and the glyphosate-resistant Class II EPSPS are indicated in blue, green and red respectively. (B) Presence of the conserved amino acid residues characteristic of Classes I $\alpha$  (blue), I $\beta$  (green) and II (red) according to Light et al. [1] in the representative species mentioned in A. Positions are given for reference sequences from V. cholerae (Class I) and C. burnetii (Class II). Stars (\*) indicate non-conserved amino acids. (PDF)

S6 Fig. Evolutionary relationships within Snodgrassella alvi (A) and Gilliamella apicola (B) species. 16S nucleotide sequences were taken from GenBank and from Motta et al. [1], the latter being indicated with genome accession numbers. K. negevensis (A) and O. hercynius (B) were chosen as outgroups. Sequences were aligned using ClustalW and trimmed to 957 sites (nucleotides 378 to 1334 of MH782110) for S. alvi and to 993 sites (nucleotides 382 to 1366 of MH782109) for G. apicola. When there were redundant aligned sequences, only one was kept. General Time Reversible model with discrete Gamma distribution and allowance for invariant sites (GTR+I+G) was selected as best-fit model of nucleotide substitution using jModelTest2 [2]. The phylogenetic trees were inferred using Bayesian analyses implemented in MrBayes V3.2.6 [3], with branch probabilities evaluated from 1 100 000 simulations, with 10% burn-in. Consensus phylogenetic trees were built by majority greedy clustering with  $\geq$  0.5 support probability. The names of species are not indicated except when other attribution has been made. The strains isolated in this work are indicated by arrows. Stars indicate sequences present in the A. mellifera gut microbiota (others are found in other Apis and Bombus species). S. alvi sequences comprising the primer sequences of Neiss-F [F1] and Neiss-R [R1] or the sequences of Beta-1009-qtF [F2] and Beta-1115-qtR [R2] are indicated in blue and red respectively. Taxa recognized by G1-459-qtF [F1] and G1-648-qtR [R1] or by Gill-F [F2] and Gill-R [R2] appear in green and yellow respectively. Primers are referenced in S1 Table. (PDF)

S1 Table. Primers used in the study.
(PDF)
S2 Table. Strains isolated from honeybee guts.
(PDF)

#### Acknowledgments

The authors are thankful to the UCA Microbiology Master students (M. Allain, E. Barbe, F. Bazi, O. Benyamna, J. Billy, H. Botchorichvili, S. Brahmi, I. Canihac, T. Capela, M. Cheymol, J. Crochepeyre, K. Dahmani, A. Dahuron, C. Deschamps, S. Etienne, M. Garofalo, L. Gaudon, A. J. Guardia Gonzalez, J. Hamet, F. Idjer, K. Kasmi, T. Kesraoui, N. S. Guerram, T. Merciecca, M. I. Moreira de Gouveia, D. Nadhir, A. Nouichi, S. Qasmi, H. L. Sow, O. Talouh, F. Tamzait, C. Touche and N. Vialle) for their help in the winter experiment. The authors are also thankful to I. Mary and E. Cano for their technical support and to Clermont Auvergne Métropole for lending a beehive site.

#### **Author Contributions**

Conceptualization: Nicolas Blot.

Formal analysis: Nicolas Blot, Loïs Veillat, Hélène Delatte.

Funding acquisition: Nicolas Blot.

Investigation: Nicolas Blot, Loïs Veillat, Régis Rouzé, Hélène Delatte.

Methodology: Nicolas Blot, Hélène Delatte.

Supervision: Nicolas Blot, Régis Rouzé.

Validation: Hélène Delatte.

Writing - original draft: Nicolas Blot.

Writing - review & editing: Nicolas Blot.

#### References

- Steinrücken HC, Amrhein N. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of Klebsiella pneumoniae 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine]. Eur J Biochem. 1984; 143: 351–357. PMID: 6381057
- Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. Environ Sci Eur. 2016; 28: 3. <u>https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0</u> PMID: <u>27752438</u>
- van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. Sci Total Environ. 2018;616–617: 255–268.
- Levine SL, von Mérey G, Minderhout T, Manson P, Sutton P. Aminomethylphosphonic acid has ow chronic toxicity to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. Environ Toxicol Chem. 2015; 34: 1382– 1389. <u>https://doi.org/10.1002/etc.2940</u> PMID: <u>25690938</u>
- Sviridov AV, Shushkova TV, Ermakova IT, Ivanova EV, Epiktetov DO, Leontievsky AA. Microbial degradation of glyphosate herbicides. Appl Biochem Microbiol. 2015; 51: 188–195.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc Biol Sci. 2007; 274: 303–313. <u>https://doi.org/ 10.1098/rspb.2006.3721</u> PMID: <u>17164193</u>
- 7. vanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J Invertebr Pathol. 2010; 103 Suppl1: S80–95.
- Johnson RM. Honey bee toxicology. Annu Rev Entomol. 2015; 60: 415–434. <u>https://doi.org/10.1146/</u> annurev-ento-011613-162005 PMID: 25341092

- 9. Rubio F, Guo E, Kamp L. Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *J* Environ Anal Toxicol. 2014; 5: 249.
- Chamkasem N, Vargo J. Development and independent laboratory validation of an analytical method for the direct determination of glyphosate, glufosinate, and aminomethylphosphonic acid in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Regulatory Science. 2017; 5: 1–9.
- Thompson HM, Levine SL, Doering J, Norman S, Manson P, Sutton P, et al. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (Apis mellifera) development using glyphosate as an example. Integr Environ Assess Manag. 2014; 10: 463–470. <u>https://doi.org/10.1002/ieam.1529</u> PMID: <u>24616275</u>
- Karise R, Raimets R, Bartkevics V, Pugajeva I, Pihlik P, Keres I, et al. Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? Chemosphere. 2017; 188: 389–396. <u>https://doi.org/10.1016/j.</u> chemosphere.2017.09.013 PMID: 28898772
- Zhu YC, Yao J, Adamczyk J, Luttrell R. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (Apis mellifera). PLoS One. 2017; 12: e0178421. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178421 PMID: 28591204
- Avigliano L, Alvarez N, Loughlin CM, Rodríguez EM. Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching, and ovarian rematuration in the estuarine crab *Neohelice granulata*. Environ Toxicol Chem. 2014; 33: 1879–1884. <u>https://doi.org/10.1002/etc.2635</u> PMID: <u>24831879</u>
- Cuhra M, Traavik T, Dando M, Primicerio R, Holderbaum D, Bøhn T. Glyphosate-residues in roundupready soybean impair Daphnia magna life-cycle. J Agric Chem Environ. 2015; 4: 24–36.
- **16.** de Aguiar LM, Figueira FH, Gottschalk MS, da Rosa CE. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 185-186: 94–101.
- Gutierrez MF, Battauz Y, Caisso B (2017) Disruption of the hatching dynamics of zooplankton egg banks due to glyphosate application. Chemosphere. 2016; 171: 644–653. <u>https://doi.org/10.1016/j. chemosphere.2016.12.110</u> PMID: <u>28056451</u>
- Simões T, Novais SC, Natal-da-Luz T, Devreese B, de Boer T, Roelofs D, et al. An integrative omics approach to unravel toxicity mechanisms of environmental chemicals: effects of a formulated herbicide. Sci Rep. 2018; 8: 11376. <u>https://doi.org/10.1038/s41598-018-29662-6</u> PMID: <u>30054531</u>
- Boily M, Sarrasin B, Deblois C, Aras P, Chagnon M. Acetylcholinesterase in honey bees (Apis mellifera) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. Environ Sci Pollut Res Int. 2013; 20: 5603–5614. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-013-1568-2</u> PMID: <u>23443944</u>
- Jumarie C, Aras P, Boily M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. Chemosphere. 2017; 168: 163–170. <u>https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.056</u> PMID: <u>27780120</u>
- Helmer SH, Kerbaol A, Aras P, Jumarie C, Boily M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (Apis mellifera). Environ Sci Pollut Res Int. 2015; 22: 8010–8021. <u>https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7</u> PMID: 24728576
- Herbert LT, Vázquez DE, Arenas A, Farina WM. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. J Exp Biol. 2014; 217:3457–3464. <u>https://doi.org/10.1242/jeb.109520</u> PMID: 25063858
- Mengoni Goñalons C, Farina WM. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. J Exp Biol. 2018; 221: jeb176644. <u>https://doi.org/10.1242/jeb.176644</u> PMID: 29643175
- Balbuena MS, Tison L, Hahn ML, Greggers U, Menzel R, Farina WM. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. J Exp Biol. 2015; 218: 2799–2805. <u>https://doi.org/10.1242/jeb.</u> <u>117291</u> PMID: <u>26333931</u>
- 25. Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota *in vitro*. Curr Microbiol. 2013; 66: 350–358. <u>https:// doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2</u> PMID: <u>23224412</u>
- Aitbali Y, Ba-M'hamed S, Elhidar N, Nafis A, Soraa N, Bennis M. Glyphosate based- herbicide exposure affects gut microbiota, anxiety and depression-like behaviors in mice. Neurotoxicol Teratol. 2018; 67: 44–49. <u>https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.002</u> PMID: <u>29635013</u>
- Kittle RP, McDermid KJ, Muehlstein L, Balazs GH. Effects of glyphosate herbicide on the gastrointestinal microflora of Hawaiian green turtles (Chelonia mydas) Linnaeus. Mar Pollut Bull. 2018; 127: 170– 174. <u>https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.11.030</u> PMID: <u>29475651</u>
- Lozano VL, Defarge N, Rocque LM, Mesnage R, Hennequin D, Cassier R, et al. Sex-dependent impact of Roundup on the rat gut microbiome. Toxicol Rep. 2017; 5: 96–107. <u>https://doi.org/10.1016/j.toxrep.</u> 2017.12.005 PMID: <u>29854581</u>

- Mao Q, Manservisi F, Panzacchi S, Mandrioli D, Menghetti I, Vornoli A, et al. The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on the microbiome. Environ Health. 2018; 17: 50. <u>https://doi.org/10.1186/s12940-018-0394-x</u> PMID: <u>29843725</u>
- Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, et al. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared *in vitro*. J Agric Food Chem. 2018; 66: 7786–7793. <u>https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212</u> PMID: <u>29992812</u>
- Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. Proc Natl Acad Sci USA. 2018; 115: 10305–10310. <u>https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115</u> PMID: <u>30249635</u>
- 32. Moran NA, Hansen AK, Powell JE, Sabree ZL. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One. 2012; 7: e36393. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393</u> PMID: <u>22558460</u>
- Kwong WK, Moran NA. Gut microbial communities of social bees. Nat Rev Microbiol. 2016; 14: 374– 384. <u>https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43</u> PMID: <u>27140688</u>
- Okuyama H, Hill J, Stephen John Martin SJ, Takahashi J-I. The complete mitochondrial genome of a Buckfast bee, Apis mellifera (Insecta: Hymenoptera: Apidae) in Northern Ireland. Mitochondrial DNA Part B. 2018; 3: 338–339.
- Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, et al. Parasite-insecticide interactions: a case study of Nosema ceranae and fipronil synergy on honeybee. Sci Rep. 2012; 2: 326. <u>https://doi.org/10.1038/srep00326</u> PMID: 22442753
- 36. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae. PLoS One. 2011; 6: e21550. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021550</u> PMID: <u>21738706</u>
- Engel P, James RR, Koga R, Kwong WK, McFrederick QS, Moran NA. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. J Apic Res. 2013; 52: 1–24.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica. 2001; 4: 9 pp.
- Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N. Transcriptome analyses of the honeybee response to Nosema ceranae and insecticides. PLoS One. 2014; 9: e91686. <u>https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0091686</u> PMID: <u>24646894</u>
- Mattila HR, Harris JL, Otis GW. Timing of production of winter bees in honey bee (Apis mellifera) colonies. Insectes soc. 2001, 48: 88–93.
- Zhu YC, Adamczyk J, Rinderer T, Yao J, Danka R, Luttrell R, et al. Spray toxicity and risk potential of 42 commonly used formulations of row crop pesticides to adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J Econ Entomol. 2015; 108: 2640–2647. https://doi.org/10.1093/jee/tov269 PMID: 26352753
- Kakumanu ML, Reeves AM, Anderson TD, Rodrigues RR, Williams MA. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. Front Microbiol. 2016; 7: 1255. <u>https://doi.org/10.3389/fmicb.</u> 2016.01255 PMID: <u>27579024</u>
- 43. Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, Walton A, Jones BM, Corby-Harris V. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (Apis mellifera). PLoS One. 2013; 8: e83125. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083125</u> PMID: 24358254
- Light SH, Krishna SN, Minasov G, Anderson WF. An unusual cation-binding site and distinct domaindomain interactions distinguish Class II enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Biochemistry. 2016; 55: 1239–1245. <u>https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00553</u> PMID: <u>26813771</u>
- Schwarz RS, Moran NA, Evans JD. Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. Proc Natl Acad Sci USA. 2016; 113: 9345–9350. <u>https://doi.org/10. 1073/pnas.1606631113</u> PMID: <u>27482088</u>
- 46. Jones JC, Fruciano C, Hildebrand F, Al Toufalilia H, Balfour NJ, Bork P, et al. Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. Ecol Evol. 2017; 8: 441–451. <u>https://doi.org/10.1002/ece3.3597</u> PMID: 29321884
- Hove-Jensen B, Zechel DL, Jochimsen B. Utilization of glyphosate as phosphate source: biochemistry and genetics of bacterial carbon-phosphorus lyase. Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78: 176–197. <u>https:// doi.org/10.1128/MMBR.00040-13</u> PMID: 24600043
- Martinson VG, Moy J, Moran NA. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Appl Environ Microbiol. 2012; 78: 2830–2840. <u>https://doi.org/10.1128/AEM.</u> 07810-11 PMID: 22307297
- Samsel A, Seneff S. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. Entropy. 2013; 15: 1416–1463.

- Larsen K, Najle R, Lifschitz A, Maté ML, Lanusse C, Virkel GL. Effects of sublethal exposure to a glyphosate-based herbicide formulation on metabolic activities of different xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. Int J Toxicol. 2014; 33: 307–318. https://doi.org/10.1177/1091581814540481 PMID: 24985121
- Nielsen LN, Roager HM, Casas ME, Frandsen HL, Gosewinkel U, Bester K, et al. Glyphosate has limited short-term effects on commensal bacterial community composition in the gut environment due to sufficient aromatic amino acid levels. Environ Pollut. 2017. 233: 364–376. <u>https://doi.org/10.1016/j. envpol.2017.10.016</u> PMID: 29096310
- 52. Hamdi C, Balloi A, Essanaa J, Crotti E, Gonella E, Raddadi N, et al. Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. J Appl Entomol. 2011; 135: 524–533.
- Kwong WK, Mancenido AL, Moran NA. Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. R Soc Open Sci. 2017; 4: 170003. <u>https://doi.org/10.1098/rsos.170003</u> PMID: <u>28386455</u>
- Raymann K, Moran NA. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. Curr Opin Insect Sci. 2018; 26: 97–104. <u>https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012</u> PMID: 29764668
- 55. Baffoni L, Gaggìa F, Alberoni D, Cabbri R, Nanetti A, Biavati B, et al. Effect of dietary supplementation of Bifidobacterium and Lactobacillus strains in Apis mellifera L. against Nosema ceranae. Benef Microbes. 2016; 7: 45–51. <u>https://doi.org/10.3920/BM2015.0085</u> PMID: <u>26565084</u>
- Li JH, Evans JD, Li WF, Zhao YZ, DeGrandi-Hoffman G, Huang SK, et al. New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. PLoS One. 2017; 12: e0187505. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187505</u> PMID: 29125851
- Anderson DD, Stover PJ. SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. PLoS One. 2009; 4: e5839. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005839</u> PMID: <u>19513116</u>
- Atherton FR, Hall MJ, Hassall CH, Lambert RW, Lloyd WJ, Ringrose PS, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of phosphonopeptides based on aminomethylphosphonic acid. Antimicrob Agents Chemother. 1982; 22: 571–578. PMID: <u>6758686</u>

# <u>Résumé</u>

L'abeille domestique, Apis mellifera, est un pollinisateur qui joue un rôle économique et écologique majeur. Les pertes de colonies d'abeilles observées depuis quelques décennies seraient le reflet d'un déclin plus global des pollinisateurs. Ce déclin aurait une origine multicausale, impliquant de nombreux facteurs de stress potentiellement capables d'interagir entre eux. Ce travail s'intéresse à l'impact de deux facteurs de stress auxquels l'abeille est fréquemment exposée : le parasite microsporidien Nosema ceranae et les insecticides neurotoxiques (substances actives ou formulations phytopharmaceutiques), ainsi qu'à leurs interactions. Un effet synergique sur la mortalité des abeilles a été observé avec certaines combinaisons. N. ceranae et les insecticides ont également induit une modulation d'activités enzymatiques et du transcriptome de l'intestin moyen de l'abeille, avec des gènes impliqués dans l'immunité, la détoxication, l'intégrité épithéliale et neuronale et le cycle cellulaire. L'association Nosema-insecticide a spécifiquement induit une modulation de gènes du système ubiquitine-protéasome et de la phosphorylation oxydative. En outre, une perturbation des espèces bactériennes majoritaires du microbiote intestinal a été mise en évidence en réponse à ces facteurs de stress. Ces travaux ont ainsi démontré des interactions entre deux insecticides et entre parasite et insecticide, et proposent des hypothèses sur le mode d'action de ces interactions qui restent à vérifier à l'échelle individuelle et de la colonie.

Mots-clés : Apis mellifera, Nosema ceranae, insecticides neurotoxiques, interaction, synergie

## ABSTRACT

The honey bee, *Apis mellifera*, is a pollinator playing a major economic and ecological role. The losses of honeybee colonies observed in the recent decades reflect a more general decline of pollinators. The origin of this decline is believed to be multicausal, implying many stressors able to interact each other. This work focuses on the impact of two stressors frequently found in the honeybee, the microsporidian parasite Nosema ceranae and neurotoxic insecticides (active ingredients or phytopharmaceutical formulations), as well as their interactions. A synergistic effect on bee mortality has been observed with certain combinations. N. ceranae and the insecticides also induced a modulation of enzymatic activities and in the honeybee midgut transcriptome, with genes involved in immunity, detoxification, epithelial and neuronal integrity and cell cycle. The Nosema-insecticide combination specifically induced a modulation of genes of the ubiquitin-proteasome system and oxidative phosphorylation. In addition, a disturbance of the major bacterial species of the intestinal microbiota has been observed in response to these stressors. This work demonstrated interactions between insecticide formulations and between a parasite and two insecticides, and proposes hypotheses on the mode of action of these interactions which remain to be verified at the individual and colony scales.

Keywords : Apis mellifera, Nosema ceranae, neurotoxic insecticides, interaction, synergy