



HAL
open science

Analyse des interactions entre le parasite *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*

Laurianne Paris

► **To cite this version:**

Laurianne Paris. Analyse des interactions entre le parasite *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. Agronomie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC062 . tel-01764895

HAL Id: tel-01764895

<https://theses.hal.science/tel-01764895>

Submitted on 12 Apr 2018

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

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

Université Clermont Auvergne

N° D.U :

ECOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT

N° d'ordre :

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et génétique moléculaires

Soutenue le 30 octobre 2017 à Clermont-Ferrand par

Laurianne PARIS

Analyse des interactions entre le parasite *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*

Membres du jury :

Rapporteurs : Dr. Luc Belzunces, *Directeur de Recherche*

Laboratoire Toxicologie Environnementale, INRA, Avignon

Pr. Marylène Poirié, *Professeur des Universités*

Evolution et Spécificité des Interactions Multitrophiques, UCA-INRA-CNRS, Sophia Antipolis

Examineurs : Dr. Marie-Pierre Chauzat, *Chargée de mission*

Unité de Pathologie de l'Abeille, ANSES, Sophia Antipolis

Dr. Ayhan Kocer, *Maître de Conférences des Universités*

Laboratoire Génétique Reproduction et Développement, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

Pr. Frédéric Delbac, *Professeur des Universités*

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

Directrice : Dr. Marie Diogon, *Maître de Conférences des Universités*

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement

UMR UCA CNRS 6023 – Equipe Interactions Hôtes-Parasites

« Il faut donner de l'amour à la science » Dr. Mohamed Alburaki, été 2013, Québec.

Pour ma part, ma thèse n'a pas réellement débuté le 1^{er} Octobre 2014, mais bien en Avril 2010, lors de mon stage de fin de DUT. Au cours des 7 années qui ont suivi, comme tout à chacun, les différentes expériences et personnes rencontrées, ont fait qu'aujourd'hui je rends ce travail de thèse, fermant un chapitre de ma vie.

De manière naturelle, mes premiers remerciements seront donc portés au Pr. Frédéric Delbac, et au Dr. Cyril Vidau, sans qui je ne serais pas là aujourd'hui puisque tous deux ont accepté de me faire confiance en m'accueillant en stage en Avril 2010.

Cyril, tu as su me transmettre tout l'amour que tu portais à la recherche. Grâce à toi, la démarche scientifique a été une révélation pour moi. Tu m'as fait connaître bon nombre de choses de ton métier : établir des plans (principalement des plans B et beaucoup de systèmes D !), échouer, rectifier, recommencer, réussir, interpréter... Tu as su me faire confiance, laisser parler mon esprit d'initiative et mon autonomie. Au cours de ce stage, j'ai compris que c'était cela que je voulais faire, travailler pour la science, quel que soit le niveau d'étude atteint. Un binôme du tonnerre, des « abeilles tout venin », et ce superbe « accent chantant du fud » qui transpire le soleil. Cette passion qui réside en toi est enviable, et ta capacité à la communiquer n'en est qu'admirable. De tout cœur, merci.

Fred... Je me souviens de ce premier mail dans lequel tu répondais à ma demande de stage et dans lequel tu m'invitais à venir en discuter. Enthousiaste mais aussi très impressionnée, la seule idée qui m'angoissait était que ma double première année d'IUT allait être un frein à mon embauche. Mais cela n'a pas semblé transparaître, et mon enthousiasme a dû prendre le pas car à deux ou trois reprises tu m'as dit « mais vous savez, parfois les expérimentations ne marchent pas, parfois nous n'avons pas de résultats concluants ». Et puis, va savoir ce qui t'as pris d'avoir accepté ! Haha ! Sacré Fred ! Début d'une aventure, si tu avais su que la blonde allait vous coller aux basques comme ça... Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir ouvert les portes de votre monde. Gourou de l'information, toujours disponible pour débattre des protocoles, répondre à mes questions de science, de fonctionnement de laboratoire ou de la recherche, à m'écouter râler (un tout petit peu) ou raconter des bêtises (à peine). Tu es quelqu'un de généreux et disponible, et je te remercie pour tout cela.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Marie Diogon, pour le travail qu'elle a accepté de partager avec moi depuis Janvier 2014 lors de mon stage de Master 2. Caractères bien trempés chacune à notre manière, nous avons malgré tout su trouver notre équilibre dans ce duo infernal. Tu as su dès le départ me faire confiance, et n'a jamais remis ma façon de travailler en doute. Et pour cela je t'en remercie. Ta confiance en mon travail a renforcé celle que j'ai dans le mien. Mais assez parlé

travail ! Je tenais surtout à te remercier pour ton affection, par tes petites attentions, tes petits mots et cadeaux. Cette grande générosité dont tu fais preuve, à travers le travail dans un sens, car je savais que je pouvais toujours compter sur toi, mais aussi sur le plan personnel. Je savais qu'en cas de problème, je pouvais venir frapper à ta porte et que je ne l'aurais pas trouvé close. Pour tout cela, merci du fond du cœur Marie.

Je remercie également les membres de ce jury, Mesdames Pr. Marylène Poirié et Dr. Marie-Pierre Chauzat, et Messieurs Dr. Luc Belzunces et Dr. Ayhan Kocer d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Également les chercheurs qui m'ont suivi au cours de mes comités de thèse : Dr. Frédéric Carvalho, Dr. Jean-Louis Couderc, Dr. Ayhan Kocer et le Dr. Luc Belzunces.

Je voulais remercier toutes les personnes constituant l'équipe IHP de 2014 à 2017, pour avoir répondu à mes appels de journées thématiques « bib'rone party » et « infection's day », notamment à l'aube de ce 22^{ème} jour de Juin 2016, jour de lancement de ma grosse manip. ou plutôt THE grosse manip. : record du laboratoire avec pas moins de 6 500 abeilles, et grâce à vous, nous avons battu ensemble le record d'abeilles infectées individuellement dans une même journée ! Merci aussi aux petites mains de passage, Laetitia et Anaïs, qui se sont greffées au projet durant de court laps de temps. Un grand merci à Elodie, qui a fourni un travail considérable et soigné durant son M2 sur les données de microbiote. Sans toi, je n'aurais pas pu avancer seule en si peu de temps. Merci pour cette collaboration mutuelle qui fût des plus agréables. Une grosse pensée pour mon trio de M2 favorites : Elodie, Isabelle et Nastasia. Une petite attention particulière pour Ivan, qui plus qu'un collègue, m'a appris les fondamentaux de la culture cellulaire, ami qui a toujours été là pour discuter avec moi de science et tant d'autres choses. Toi et ta petite famille vous êtes super, ne changez pas.

Bien évidemment, je voulais remercier toutes les personnes suivantes, qui ont su donner au quotidien du peps et des couleurs à cette thèse. Merci en particulier à Yvette, Nathalie et Brigitte, super petit trio toujours là pour répondre à mes questions de naïve petite thésarde. Vous êtes géniales les filles ! Merci à tous les thésards, anciens et actuels, que j'ai pu rencontrer, pas forcément très souvent mais toujours dans des moments agréables ! Merci aux thésards IHP, à Johan, qui a passé le flambeau, Manon et Céline que j'adore tout particulièrement, et que je remercie pour ces soirées filles ! Vous êtes super ! Merci aux membres du bureau bleu, en particulier Amélie, Thomas, et Thiphaine pour votre bonne humeur et votre fraîcheur ! Merci aux membres du « LMGE côté CHU », bien sûr Anne, Jérôme et cet incroyable rire que j'adore malgré la concurrence que tu me fais, et enfin, ma très chère Claire, parce que « Claire, moi je l'aime bien » ! Enfin, un grand grand merci à mes chouchous : Benjamin (mon Bendji Jirak®), Florent (Rossignol) et Louis (le petit, le Saint (haha !)). J'ai adoré vous connaître et vous côtoyer au quotidien. Vous êtes des personnes incroyables, bosseurs mais pas que !

Vous êtes généreux et attentifs avec vos amis. Vous avez toujours été là, pour faire les quatre-cents coups certes, mais aussi pour écouter, discuter de tout et de rien, Ben pour me consoler quand le moral était au plus bas. Bref, vous avez le cœur sur la main, je vous adore ! Restez comme vous êtes !

Et vous, mes amis de plus longue date, qui ont su être là, dans les bons et excellents moments, mais aussi dans les pires... Ma Stéphanie, ma Dou², qui me supporte depuis le lycée, quel exploit ! Ma Mélodie, ma Limo, sans qui ma scolarité universitaire n'aurait pas été la même ! Ma Mélanie, mon Eve, soutient inconditionnel, toujours présente en cas de besoin malgré la distance et qui, à mon avis, va me supporter jusque bien vieille ma poulette ! Et toi, mon rien qu'à moi Peter Meuwine ! Mon acolyte de master qui m'a tellement manqué durant toute cette thèse, j'ai beaucoup moins rigolé en salle de manip. sans toi ! Vous quatre qui m'avez supporté pendant cette thèse, vous, que j'aime tellement et que j'espère garder longtemps avec moi ! J'ai aussi une pensée particulière à tous ces amis que j'ai un peu perdu de vue durant cette thèse, la vie faisant que chacun poursuit sa route, mais je sais que dans nos cœurs l'amitié est intacte : Valérie, Floflo, Anne-Claire, Emeline, Muriel, Franck, Xavier, mon faux vrai jumeau, Caroline, Éric... Et j'en oublie sûrement dans ce texte mais pas dans mon cœur. Bien sûr, Lucie... Nous pensons tous bien souvent à toi et tu nous manques tellement à tous, particulièrement dans ces moments dont nous aimerions débattre avec toi pour avoir ton avis singulier et éclairé.

Pour sûr, j'ai gardé les plus chers à mon cœur pour la fin.

Un grand merci, mais le mot est bien faible pour ce que je ressens, à mes parents, Catherine et Michel, sans qui, vous vous en doutez, je ne serais pas là aujourd'hui. La vie est ce qu'elle est, avec des hauts et des bas. Mais ne vous en faites pas, c'est également cela qui nous construit. Vous avez su nous inculquer des valeurs importantes durant toute notre vie : l'amour, la famille, le travail, la compassion, le dévouement, l'intégrité, la justice et l'humilité. Toutes ces valeurs qui doivent définir le fil conducteur de notre vie et desquelles il faut essayer de ne pas s'éloigner. Merci pour tout cela et pour bien d'autres choses. Je vous aime.

Et ma fratrie ! Pierrick, Anne-Lyse, Luc et Faustine, comme je vous aime également ! Et que je suis fière d'être votre sœur, petite pour certains, grande pour d'autres ! Merci d'être ce que vous êtes. Pour rien au monde je ne vous échangerais contre d'autres frères et sœurs, ou même pour une vie sans fratrie. J'ai aimé passer ma vie à vos côtés, et j'espère que le reste de ma vie se passera aussi bien avec vous. Et tous mes adorables petits neveux et nièces Gabriel, Angéline et Maëlle que j'aime et qui j'espère me pardonneront de ne pas avoir été présente ces dernières semaines ! Merci également à Bernard, Régine, Véronique et David de partager nos vies et de les agréments d'avantage. Enfin merci à Chantal et Georges, beaux-parents formidables, que là également je n'échangerais pour rien au monde.

Et enfin, je te remercie toi, Michaël, mon soutien et ma force. Depuis presque 7 ans tu me portes et me supportes. Dans les bons et les mauvais moments. Tu as su m'épauler durant tout ce projet, m'écouter et me soutenir dans les nombreux moments difficiles, me rassurer dans les moments de doute. J'ai adoré confronter ton expertise à mes idées, élaborer des plans, recevoir tes conseils, et sans cesse échanger. J'ai adoré toutes ces heures au rucher avec toi. Tu as été mon meilleur formateur. Travaillant ensemble, nous avons su faire la part des choses et rester professionnels, et montrer à certains que partager sa vie et son travail avec quelqu'un n'est pas voué à l'échec. Je te remercie d'ailleurs une nouvelle fois fortement pour avoir accepté de mettre en cagettes 6 500 abeilles, de 21h à 3h du matin ! Tous ne le feraient pas, binôme dans la vie ou non. Peut-être qu'un jour nos chemins professionnels se recroiseront, et je n'en serais que ravie. J'aime cette complémentarité que l'on a l'un envers l'autre et j'espère qu'elle durera encore de nombreuses années, pour la vie à laquelle nous aspirons. Je t'aime.

Résumé

De nombreuses études suggèrent que le déclin des colonies d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) serait dû à l'action combinée de plusieurs facteurs de stress, et notamment des agents pathogènes et des pesticides. Nous avons précédemment démontré qu'une co-exposition des abeilles au parasite intestinal *Nosema ceranae* et à l'insecticide fipronil, administré chroniquement en doses sublétales, entraînait une forte augmentation de la mortalité des abeilles. De plus, des études suggèrent que l'infection par *N. ceranae* pourrait augmenter la capacité antioxydante des cellules intestinales de l'abeille. Nous nous sommes demandé si l'élévation du taux de mortalité dans un contexte d'infection, combiné à une intoxication au fipronil, pourrait être le résultat d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Nos résultats indiquent une diminution de la quantité des ERO, mais aussi de la quantité de protéines oxydées en présence de *N. ceranae*. Ceci pourrait être la résultante d'une augmentation des activités enzymatiques antioxydantes. Lorsque les abeilles ont été traitées avec les deux facteurs de stress (*N. ceranae* et fipronil), nous n'avons cependant pas mesuré d'augmentation des ERO, tandis que l'oxydation des protéines était significativement augmentée. Ainsi, la présence du parasite semble perturber la balance oxydative des cellules intestinales et pourrait augmenter la toxicité du fipronil.

Des études complémentaires ont également été menées *in vitro* sur des cellules humaines HFF, infectées avec une autre espèce microsporidienne, *Encephalitozoon cuniculi*, et/ou exposées au fipronil. Les résultats ont montré que la présence du parasite limitait l'augmentation des ERO induite par le fipronil. De plus, des résultats préliminaires tendent à montrer une augmentation de l'activité métabolique des mitochondries dans les cellules infectées par le parasite.

Enfin, dans le but de mieux comprendre le dialogue *N. ceranae*/abeille/microbiote intestinal, nous avons analysé par une approche de séquençage d'amplicons d'ADNr et d'ARNr 16S la composition et l'abondance des communautés microbiennes de l'intestin après infection et/ou intoxication chronique avec différents pesticides. *N. ceranae* semble perturber l'activité de plusieurs groupes bactériens, et la présence de pesticides accroît fortement ces perturbations. Ainsi, l'impact d'une co-exposition *N. ceranae*/pesticides sur le microbiote intestinal pourrait être l'un des éléments clés du déclin des colonies.

Mots clés : *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, fipronil, stress oxydant, ERO, culture cellulaire, microbiote.

Abstract

Many studies suggest that the observed decline of *Apis mellifera* honeybee colonies would be due to the combined action of multiple stressors, including both pathogens and pesticides. We previously demonstrated that the honeybee co-exposure to the gut parasite *Nosema ceranae* and the fipronil insecticide, administered chronically in sublethal doses, highly increased the bee mortality. Moreover, studies suggest that the infection by *N. ceranae* may increase the antioxidant capacity of the bee intestinal cells. We wondered whether the increase in mortality rate when infection is combined with fipronil intoxication could be the result of reactive oxygen species (ROS) production.

Our results indicate that both the ROS amount and the concentration of oxidized proteins decreased upon infection. This could be the result of an increased antioxidant enzymatic activities. When bees were co-exposed to both stressors (*N. ceranae* and fipronil), we did not measure any increase in ROS level, but the amount of oxidized proteins was significantly increased. Thus, the presence of the parasite seems to disrupt the oxidative balance of the intestinal cells and could increase the toxicity of fipronil.

Complementary studies were also conducted *in vitro* with human cells (HFF), infected with a different microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi*, and/or treated with fipronil. The results showed that the presence of the parasite reduced the increase in ROS induced by fipronil. In addition, preliminary results showed an increase in mitochondrial metabolic activity in cells infected with the parasite.

Finally, in order to better understand the *N. ceranae*/honeybee/intestinal microbiota dialogue, we analysed the composition and the abundance of microbial communities in the gut after infection and/or intoxication with different pesticides using a next generation sequencing of both rDNA and rRNA 16S amplicons. *N. ceranae* seems to upset the activity of different groups of bacteria, and the presence of pesticides greatly increased these disturbances. Thus, the impact of *N. ceranae*/pesticide co-exposure on the intestinal microbiota may be one of the key elements in the decline of honey bee colonies.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, fipronil, oxidative stress, ROS, cell culture, microbiota.

Abréviations

AChe	acétylcholinestérase	HOB	p-hydroxy-benzoate de méthyle
ADN	acide désoxyribonucléique	HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
Afssa/Afsset	Agence française de sécurité des aliments / Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. Ces deux anciens établissements publics ont fusionné pour créer l'ANSES en 2010.	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
AKH	<i>adipokinetic hormone</i>	IRC	<i>immune-regulated catalase</i>
AMM	autorisation de mise sur le marché	ITSAP	institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et la Pollinisation
ANSES	Agence National de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail	LMR	limite maximale de résidus
ARN	acide ribonucléique	LOOH	lipide peroxydé
ARNi	ARN interférent	MetAP1 et MetAP2	méthionines aminopeptidases de types 1 et 2
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
CaE	carboxylestérase	NOX	NADPH oxydase
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole	OE	oléate d'éthyle
DGGE	<i>denaturing gradient gel electrophoresis</i>	OMG	organisme génétiquement modifié
DDT	dichlorodiphényltrichloroéthane	PAM	peptides antimicrobiens
DNP	2,4-dinitrophenyl	PVDF	polyvinylidene fluoride
DNPH	2,4-dinitrophénylhydrazine	PG	peptidoglycane
DUOX	dual oxydase	PM	<i>peritrophic membrane</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>	PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Efsa	<i>European Food Safety Authority</i>	Prx	peroxyrédoxine
EnP	<i>endospore protein</i>	PTP	protéine du tube polaire
ERA	espèces réactives de l'azote	REP	réflexe d'extension du proboscis
ERO	espèces réactives de l'oxygène	RLO	radicaux libres de l'oxygène
ER	<i>endoplasmic reticulum</i>	RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
FAD	flavine adénine dinucleotide	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>	ROOR	peroxyde organique
FISH	<i>fluorescence in situ hybridation</i>	RT	<i>room temperature</i>
GABA	acide γ -aminobutyrique	SDS	dodécylsulfate de sodium
GABA-R	GABA récepteur	SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
GluCl-R	récepteur des canaux chlorure activés au glutamate	SNC	système nerveux central
GPx	glutathion peroxydase	SOD	superoxyde dismutase
GSH	glutathion	SWP	<i>spore wall protein</i>
GST	glutathion-S-transférase	TBS-T	tris-buffer saline and Tween 20
HFF	<i>human foreskin fibroblast</i>	TfR1	récepteur de la transferrine
HJ	hormone juvénile	Trx	thiorédoxine
		UV	ultraviolet
		VIH	virus de l'Immunodéficience Humaine
		Vg	vitellogénine
		8-OHdG	8OH-désoxyguanosine
		9-HDA	acide 9-hydroxy-2-décénoïque
		9-ODA	acide 9-oxo-2-décénoïque

Index des Figures et Tableaux

Les figures et tableaux sont placés en regard du texte figurant à la page indiquée ci-dessous :

Figure 1. Evolution du nombre de ruches entre 1961 et 2014 dans le Monde, aux USA, en Europe et en France	1
Figure 2. Présentation des différents objectifs du projet ANR BEELOSS dans lequel s'inscrit mon projet de thèse	3
Figure 3. Phylogénie des microsporidies des genres <i>Encephalitozoon</i> et <i>Nosema</i>	5
Figure 4. Phylogénie et principales caractéristiques des espèces microsporidiennes dont les génomes ont été entièrement séquencés	6
Figure 5. Taxonomie des microsporidies proposée dans les années 1980	6
Figure 6. Classification fonctionnelle des organites d'origine mitochondriale	7
Figure 7. Représentation schématique du mitosome chez les microsporidies	7
Figure 8. Structure des spores microsporidiennes d' <i>E. cuniculi</i> et de <i>N. ceranae</i>	8
Figure 9. Les différentes étapes de la dévagination du tube polaire et de la libération du sporoplasme	10
Figure 10. Principaux types d'interfaces microsporidies-cellules hôtes	11
Figure 11. Modèle du mécanisme d'invasion et de formation de la vacuole parasitophore	11
Figure 12. Représentation schématique des cycles de vie de différents genres microsporidiens	12
Figure 13. Détachement des cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille infectée par <i>Nosema</i> sp.	12
Figure 14. Cycles de développement d' <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	13
Figure 15. Développement d' <i>Encephalitozoon</i> chez l'Homme	13
Figure 16. Distribution géographique des espèces <i>Nosema</i> dans les colonies d' <i>Apis mellifera</i>	15
Figure 17. Distribution mondiale de la microsporidie <i>Nosema ceranae</i> dans différentes espèces d'Apoïdes	15
Figure 18. Localisation des ruchers prospectés en Auvergne pour la détection de <i>N. ceranae</i>	16
Figure 19. Les différentes castes présentes au sein d'une colonie d'abeilles domestiques	17
Figure 20. Les trois stades de développement des abeilles pré-émergence	17
Figure 21. Cycle de développement de <i>Nosema ceranae</i>	18
Figure 22. L'ouvrière : une travailleuse hors norme	20
Figure 23. L'auto-toilettage des abeilles	21
Figure 24. Principaux hémocytes présents dans l'hémolymphe des insectes et fonctions	30
Figure 25. Les différentes voies immunitaires chez l'abeille	30
Figure 26. Evolution de la propagation de l'acarien parasite <i>Varroa destructor</i> chez l'abeille <i>Apis mellifera</i>	32
Figure 27. Effets écologiques de l'exposition aux pesticides systémiques sur différentes classes d'organismes selon différentes voies d'exposition	38
Figure 28. Contamination des différents compartiments environnementaux par les pesticides	38
Figure 29. Différents domaines d'utilisation des pesticides	39
Figure 30. Cartes de contamination des eaux de surfaces et souterraines en France en 2013	39
Figure 31. Multiples voies d'exposition des abeilles aux pesticides	40
Figure 32. Mode d'action du fipronil sur les récepteurs GABA	43

Figure 33. Dégradation du fipronil dans le sol et de ses principaux métabolites	44
Figure 34. Schéma du processus de détoxication chez l'abeille <i>Apis mellifera</i>	45
Figure 35. Représentation schématique de la balance oxydante	50
Figure 36. Production et élimination des ERO suite à la respiration mitochondriale	53
Figure 37. Réduction tétravalente de la molécule de dioxygène en H ₂ O : production d'ERO intermédiaires au cours de la respiration mitochondriale	53
Figure 38. Les sept isoformes de NADPH oxydases (NOX/DUOX) actuellement décrites	54
Figure 39. DUOX et immunité intestinale chez les insectes	54
Figure 40. Mécanismes de peroxydation des lipides par les espèces réactives oxygénées	57
Figure 41. Oxydation de la guanine et mésappariement	58
Figure 42. Mécanisme de régulation de la DUOX (dual oxydase) dans la réponse immunitaire innée épithéliale chez la <i>Drosophile</i>	60
Figure 43. Les systèmes antioxydants	61
Figure 44. Récapitulatif des voies métaboliques à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène	62
Figure 45. Représentation schématique des mécanismes de détoxication de la nicotine proposés chez l'abeille	64
Figure 46. Sonde fluorescente moléculaire CM-H ₂ DCFDA	66
Figure 47. Protocole de mesure des espèces réactives de l'oxygène sur intestins d'abeilles	67
Figure 48. Protocoles expérimentaux développés pour la mesure du stress oxydant de l'intestin de l'abeille	68
Figure 49. Phylogénie des microsporidies des genres <i>Encephalitozoon</i> et <i>Nosema</i>	90
Figure 50. Localisation et composition des communautés bactériennes du tractus digestif de l'abeille	110
Figure 51. Evolution du microbiote intestinal des abeilles au cours du développement	110
Figure 52. Abondances relatives de l'ADN des communautés bactériennes et fongiques de l'intestin de l'abeille	111
Figure 53. Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de France métropolitaine en 2013	113
Figure 54. Pesticides les plus quantifiés dans les eaux souterraines de France métropolitaine en 2013	113
Figure 55. Schéma conceptuel du fonctionnement de la balance oxydante	144
Figure 56. Extrusion lipidique depuis les cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille en présence de fipronil	147
Tableau 1. Protéines du tube polaire (PTP) chez différentes espèces microsporidiennes	9
Tableau 2. Principales caractéristiques des microsporidies <i>E. cuniculi</i> et <i>N. ceranae</i>	10
Tableau 3. Virus présents chez les abeilles domestiques européennes	33
Tableau 4. Toxicité de différents pesticides sur l'abeille, comparée au DDT	45
Tableau 5. Fréquence de détection du fipronil et de deux de ses métabolites, et concentrations moyennes retrouvées dans les différentes matrices de la ruche	46
Tableau 6. Modulations physiologiques induite par le fipronil chez <i>Apis mellifera</i>	49
Tableau 7. Principales espèces réactives azotées et oxygénées produites dans les cellules	50
Tableau 8. Systèmes enzymatiques antioxydants prédits dans le génome d' <i>A. mellifera</i> et mesure de l'activité de certains d'entre eux lors d'une infection par <i>N. ceranae</i>	63
Tableau 9. Résumé des principales fonctions du microbiote intestinal de l'abeille	109

Sommaire

Communications orales et publications

Communications orales

Posters

Publications scientifiques

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Etude bibliographique

Les microsporidies : parasites eucaryotes uniques	5
1. Histoire et caractéristiques des microsporidies	5
1.1. Caractères particuliers	6
1.2. La spore microsporidienne	8
2. Cycle de développement des microsporidies.....	10
3. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>, une microsporidie bien connue.....	12
3.1. L'encéphalitozoonose.....	13
3.2. Traitement.....	14
4. <i>Nosema ceranae</i>, un nouveau parasite de l'abeille domestique	15
4.1. L'abeille domestique <i>Apis mellifera</i>	16
4.2. Caractéristiques générales de la nosérose de l'abeille.....	17
4.3. La nosérose et la colonie	20
4.3.1. Effets sur la colonie	20
4.3.2. L'immunité sociale.....	21
4.4. La nosérose et l'abeille : l'abeille et la bête	23
4.4.1. Effets de <i>N. ceranae</i> sur la mortalité des individus	23
4.4.2. Effets de <i>N. ceranae</i> sur les activités de butinage.....	24
4.4.3. Effet de <i>N. ceranae</i> sur l'apprentissage et la mémoire	26
4.5. <i>N. ceranae</i> perturbe la physiologie de l'abeille	26
4.5.1. Effets sur l'intégrité de l'intestin	26
4.5.2. <i>N. ceranae</i> perturbe-t-il la nutrition de l'abeille ?.....	27
4.5.3. Effets à l'échelle moléculaire : perturbations hormonales.....	28
4.6. L'abeille face à <i>Nosema</i>	29
4.6.1. L'abeille, taillée pour se défendre	29
4.6.2. Immunité cellulaire.....	30

4.6.3. Immunité humorale.....	30
4.7. Les interactions avec <i>Nosema</i>	32
4.7.1. <i>Nosema</i> et les acariens.....	32
4.7.2. <i>Nosema</i> et les virus	33
4.7.3. <i>Nosema</i> , les bactéries et autres champignons.....	33
4.7.4. <i>Nosema</i> et les autres endoparasites	34
4.7.5. <i>Nosema</i> et les pesticides	35
4.8. Modulation de la virulence et moyens de lutte	36
Les pesticides : impacts sur la santé des abeilles	38
1. Devenir des pesticides dans l'environnement	38
2. Les multiples voies d'expositions des abeilles aux pesticides	40
3. Cas du fipronil, un insecticide de la famille des phénylpyrazoles	41
3.1. Mode d'action et toxicité	43
3.2. Dégradation du fipronil	44
3.2.1. Devenir du fipronil dans l'environnement	44
3.2.2. Métabolisation du fipronil chez l'abeille	44
4. Effets du fipronil sur les abeilles.....	45
4.1. Effets à l'échelle individuelle et sur la colonie	46
4.1.1. Effet du fipronil en faible dose sur la mortalité.....	46
4.1.2. Effet du fipronil sur les activités de butinage : atteintes des processus d'apprentissage, de mémorisation et de locomotion.....	47
4.1.3. Effet du fipronil sur la reproduction	48
4.1.4. Effet du fipronil sur l'immunité.....	48
4.2. Effet de la co-exposition Fipronil- <i>Nosema</i>	49
5. Modulations physiologiques chez l'abeille induite par le fipronil	49
Le stress oxydant : ERO, hic de l'homéostasie ?.....	50
1. Les différentes Espèces Réactives de l'Oxygène	50
2. Les sources de production des ERO : paradoxe du stress oxydant.....	51
2.1. Facteurs exogènes	52
2.2. Facteurs endogènes.....	52
2.2.1. La respiration mitochondriale	53
2.2.2. NOX et DUOX.....	53
2.2.3. Les autres compartiments cellulaires.....	54

a.	Le réticulum endoplasmique.....	54
b.	Peroxisomes et lysosomes	55
3.	Les ERO : bonnes ou mauvaises pour la cellule ?	55
3.1.	Le pouvoir protecteur des ERO	55
3.2.	Signalisation cellulaire et régulation des ERO	56
3.3.	Lipides, protéines et ADN : les cibles favorites des ERO	57
3.4.	Le processus de vieillissement	58
3.5.	ERO <i>or not</i> ERO : déclenchement des processus d'apoptose et d'autophagie.....	59
3.6.	Hôte, microbiote et agents pathogènes : un ménage à trois.....	60
4.	Antioxydants en balance : la protection contre le stress oxydant	60
4.1.	Les antioxydants enzymatiques.....	60
4.2.	Les antioxydants non-enzymatiques	61
4.3.	Cas de la N-acétylcystéine	62
4.4.	Les systèmes de réparation post-ERO	62
5.	Stress oxydant, abeilles et <i>Nosema ceranae</i>.....	63

Chapitre 2 : Effet conjoint de <i>Nosema ceranae</i> et du fipronil sur la balance oxydante de l'intestin de l'abeille domestique	65
--	-----------

Chapitre 3 : Impact de la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi* et du fipronil sur le stress oxydant dans les cellules de mammifères en culture *in vitro*

1.	Choix du modèle cellulaire et microsporidien	88
1.1.	La culture des cellules d'abeille : un succès éphémère ?	89
1.2.	Cultiver <i>N. ceranae</i> en culture de cellule, un défi difficile à relever	89
1.3.	Les cellules HFF.....	89
1.4.	Mise en culture de <i>N. ceranae</i> : limiter l'apport de bactéries	90
1.5.	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> , une alternative à <i>Nosema</i>	90
2.	Choix des protocoles expérimentaux	91

Chapitre 4 : Effet conjoint de *Nosema ceranae* et de pesticides sur la composition du microbiote intestinal de l'abeille

1.	Le microbiote intestinal de l'abeille	109
2.	Microbiote, <i>Nosema</i> et pesticides	110

3. Les autres pesticides étudiés lors de ma thèse	110
3.1. Cas du thiaméthoxame, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes	111
3.1.1. Description	111
3.1.2. Thiaméthoxame, abeille et Nosema.....	112
3.2. Cas d'un fongicide : le boscalide	113
3.2.1. Description	113
3.2.2. Boscalide et abeilles	113

Chapitre 5 : Discussion générale

1. Nosema ceranae, Apis mellifera et stress oxydant.....	138
1.1. La réponse immunitaire intestinale est-elle déclenchée en réponse à l'infection par <i>N. ceranae</i> ?.....	138
1.2. La présence de <i>N. ceranae</i> génère-t-elle une augmentation de la production des ERO dans les cellules intestinales de l'abeille ? L'infection est-elle responsable d'un déséquilibre de la balance pro- et antioxydants (Paris <i>et al.</i> , 2017) ?.....	140
1.3. Les microsporidies cultivées <i>in vitro</i> induisent-elles un stress oxydant (Chapitre 3) ?	142
1.4. Comment la co-exposition <i>N. ceranae</i> /fipronil influence-t-elle la production d'ERO ?	143
1.4.1. Pourquoi les antioxydants n'engendrent-ils pas forcément une diminution des ERO ?	144
1.4.2. Le fipronil modifie-t-il la production des ERO ? Qu'en est-il lorsque les cellules sont infectées par une microsporidie ?.....	145
1.4.3. Quels sont les effets du fipronil seul ou en présence de <i>N. ceranae</i> sur l'oxydation des lipides et des protéines ?.....	145
2. Les réserves lipidiques, un paramètre important de l'interaction <i>N. ceranae</i>/fipronil/abeille ?	147
3. Comment <i>N. ceranae</i> et le fipronil influencent-ils les communautés microbiennes de l'intestin de l'abeille (Chapitre 4) ?	147
3.1. Y a-t-il un lien entre dysbiose intestinale et stress oxydant chez l'abeille ?	150
4. Perspectives	151
4.1. Améliorer les outils pour les études <i>in vitro</i>	151
4.2. L'ARN interférent, une solution pour l'étude des voies métaboliques chez l'abeille ..	152
5. Conclusion	153

Références bibliographiques

Sommaire des références bibliographiques.....	155
--	------------

Annexes

Annexe 1 : Taille des génomes microsporidiens	185
Annexe 2 : Anatomie d'une abeille ouvrière adulte.....	186
Annexe 3 : Principaux agresseurs des colonies d'abeilles	187

Communications orales et publications

Communications orales

En souligné, le nom de la ou les personnes ayant présenté la communication.

➤ Communication antérieure à la thèse :

Vidau C., **Paris L.**, Vignes B., Aufauvre J., Fontbonne R., Blot N., Diogon M., Texier C., El Alaoui H., Brunet JL., Belzunces LP., Delbac F. Effet d'une infection avec *Nosema ceranae* sur la sensibilité des abeilles à des doses sublétales de fipronil et d'imidaclopride. **Journées Scientifiques Apicoles** – Arles, France – 11 février 2011.

➤ Communications auprès du grand public :

Paris L., Guyot S., Roriz D., Panek J., El Alaoui H., Roussel M. Les abeilles amenées à disparaître. **Fête de la Science** – Clermont-Ferrand, France – 9 octobre 2014.

Paris L. Analyse des interactions entre le parasite intestinal *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. **Echanges Doctorants/Lycéens** – Lycée Sidoine Apollinaire - Lycée des métiers des services aux entreprises, Clermont-Ferrand, France – 29 mars 2016.

Paris L. Co-exposition au parasite intestinal *Nosema ceranae* et à l'insecticide fipronil : perturbation de la balance oxydante dans l'intestin de l'abeille *Apis mellifera*. **5^{ème} Journées de la Recherche Apicole** – ITSAP Institut de l'Abeille – **Interview** publiée sur YouTube le 20 mars 2017 : [Interview JRA 2017 - Laurianne Paris - Youtube](#)

➤ Ma thèse en 180 secondes – MT180 :

Analyse des interactions entre le parasite intestinal *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. **Ma Thèse en 180 secondes – MT180** – Finale Régionale – Clermont-Ferrand, France – 12 avril 2017.

➤ Communications au sein du pôle scientifique clermontois :

Paris L., Blot N., Diogon M. Analyse des interactions entre le parasite intestinal *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. **Journées Des Doctorants du LMGE** – Clermont-Ferrand, France – 5 février 2015.

Paris L., Diogon M. Analyse des interactions entre le parasite intestinal *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. **Journées Des Doctorants du LMGE** – Clermont-Ferrand, France – 16 mars 2017.

➤ **Communications lors de congrès scientifiques :**

Paris L., Roussel M., Delbac F., Diogon M. Causes and consequences of Reactive Oxygen Species production in the gut of honeybees exposed to the parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. **The Seventh Eurbee Congress of Apidology (Eurbee7)** – Cluj-Napoca, Roumanie – 7-9 septembre 2016.

Paris L., Roussel M., Pereira B., Delbac F., Diogon M. La co-exposition au parasite intestinal *Nosema ceranae* et à l'insecticide fipronil engendre une perturbation de la balance oxydante dans l'intestin de l'abeille *Apis mellifera*. **5^{ème} Journées de la Recherche Apicole** – ITSAP Institut de l'Abeille – Paris, France – 8 et 9 février 2017.

Posters

En souligné, le nom de la personne ayant présenté le poster.

Moné A., **Paris L.**, Debroas D., Delbac F., Diogon M., Blot N., El Alaoui H. Evaluation de l'impact de différents facteurs de stress (polluants et pathogènes) sur le microbiote intestinal de l'abeille domestique *Apis mellifera*. **Forum EcoTox Rovaltain** – Valence, France – 11-13 octobre 2016.

Paris L., Roussel M., Pereira B., Delbac F., Diogon M. La co-exposition au parasite intestinal *Nosema ceranae* et à l'insecticide fipronil engendre une perturbation de la balance oxydante dans l'intestin de l'abeille *Apis mellifera*. **Journées de l'Ecole Doctorale** – Clermont-Ferrand, France – 18-19 mai 2017.

Publications scientifiques

➤ **Article publié :**

Paris L., Roussel M., Pereira B., Ferrandon D., Delbac F., Diogon M. (2017) Disruption of the oxidative balance in the gut of the honeybees *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil. *Microbial Biotechnology*.

➤ **Articles en préparation :**

Paris L., Delbac F., Wawrzyniak I., Diogon M. (*in prep*) Effect of the insecticide fipronil on oxidative status in human foreskin fibroblast cells infected with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*.

Paris L., Moné A., Peghaire E., Diogon M., Debroas D., Delbac F., El Alaoui H. (*in prep*) Gut dysbiosis induced by co-exposition to pesticides and *Nosema ceranae* in the western honeybee *Apis mellifera*.

➤ **Articles en préparation, en parallèle à la thèse :**

J'ai parallèlement à mes travaux de thèse participé à des projets qui donneront lieu à des publications portant sur les travaux de :

- Roussel M., qui a mené des tests de traitements contre la nosémose sur des colonies d'abeilles maintenues sous tunnel,
- Diogon M., qui a travaillé sur l'étude des réserves lipidiques chez les abeilles exposées à *N. ceranae* et/ou au fipronil,
- Pereira B., qui souhaite utiliser mes données expérimentales issues de la publication Paris *et al.* (2017) pour développer un modèle statistique.

Introduction

*« Happyculteur : personne qui fait son miel
avec des petits bonheurs de l'existence »*

Alain Crehange

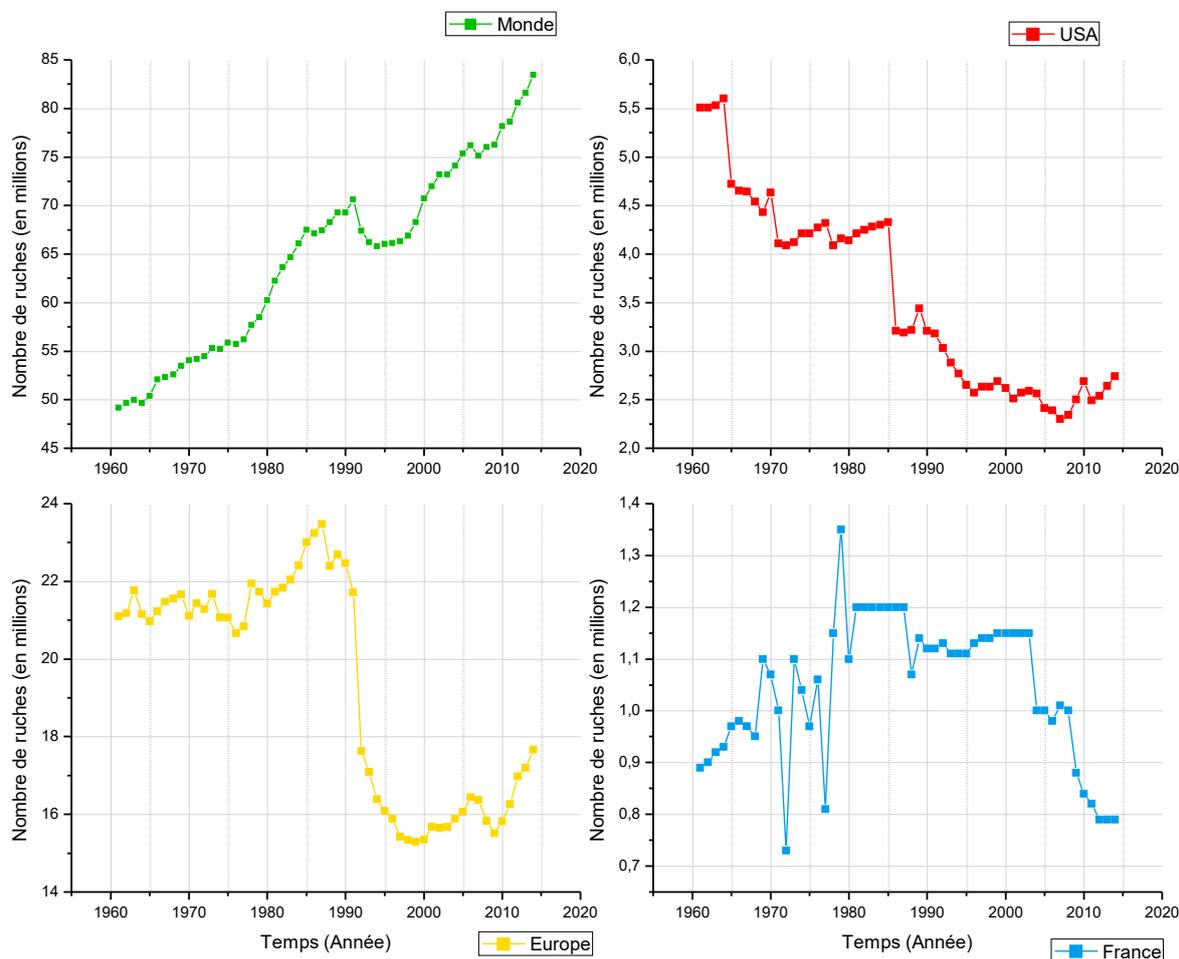


Figure 1. Evolution du nombre de ruches entre 1961 et 2014 dans le Monde, aux USA, en Europe et en France. Alors que le nombre de ruches à l'échelle mondiale est globalement en constante augmentation depuis 1961 (courbe verte), leur nombre a fortement diminué aux USA depuis 1965 (courbe rouge). En Europe, c'est à partir de la fin des années 80 que les pertes de colonies ont été extrêmement importantes, avec 35% de perte en 12 ans (courbe jaune), mais l'augmentation observée depuis 2009 reste encourageante. En France, la perte d'environ 27% des ruches observée depuis 2003 semble s'être stabilisée depuis 2011 (courbe bleue) (d'après les chiffres de la *Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), FAOSTAT, 2017*).

Introduction

Les insectes pollinisateurs, et notamment les abeilles, jouent un rôle prépondérant dans la pollinisation des plantes cultivées et la conservation de la biodiversité des écosystèmes naturels. Les abeilles sauvages et domestiques, et en particulier *Apis mellifera*, contribuent en effet à la pollinisation de 80% des espèces de plantes à fleurs, raison pour laquelle l'abeille est considérée comme un insecte d'intérêt agro-économique de premier ordre (Klein *et al.*, 2007). Malheureusement, depuis plusieurs décennies, les populations d'abeilles domestiques sont confrontées à des mortalités massives sans que les causes ne soient clairement identifiées (Potts *et al.*, 2010). Malgré une augmentation croissante du nombre de colonies à l'échelle mondiale depuis 1960, d'importantes pertes ont été observées dans plusieurs régions du monde et en particulier aux Etats-Unis et en Europe (Figure 1). À titre d'exemple, le nombre de colonies d'abeilles domestiques en Europe a diminué de 3,8 millions entre 1980 et 2014, soit une baisse d'environ 18% (FAO, 2017), et a atteint 40,4% dans certains ruchers de Belgique à la sortie de l'hiver 2013 (Chauzat *et al.*, 2014).

Ces pertes entraînent des problèmes écologiques et économiques majeurs pour l'apiculture et l'agriculture, ainsi que pour la conservation de la biodiversité. La valeur économique de la pollinisation sur les denrées alimentaires a été estimée en 2005 à 153 milliards d'euros, basée sur la dépendance aux pollinisateurs des principales cultures alimentaires, soit 9,5% de la valeur de la production agricole mondiale (Gallai *et al.*, 2009).

Malgré les nombreuses études menées pour tenter d'élucider ce déclin des colonies, aucune cause unique n'a pu être clairement identifiée. L'hypothèse la plus probable serait l'action combinée de plusieurs facteurs de stress comprenant des facteurs biotiques tels que les pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites), l'apparition de nouveaux prédateurs (frelon asiatique) ou ravageurs (petit coléoptère de la ruche), mais aussi des facteurs abiotiques tels que les substances chimiques (pesticides, polluants industriels), l'intensification des monocultures et la modification des paysages qui appauvrissent la diversité et la qualité des ressources alimentaires (Goulson *et al.*, 2015), les conditions climatiques ou encore les champs électromagnétiques. Les facteurs socio-économiques tels que le commerce international de colonies ou la transhumance intensive des colonies pour la pollinisation, ont également été incriminés (vanEngelsdorp and Meixner 2010). Ce sont autant de facteurs pouvant interagir négativement de façon additionnelle, voire synergique, sur l'abeille et la colonie (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012).

La microsporidie *Nosema ceranae*, initialement décrite chez l'abeille asiatique *Apis cerana*, fait désormais partie des agents pathogènes les plus fréquemment retrouvés chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. Ce micro-champignon est un parasite intracellulaire obligatoire de l'abeille altérant l'épithélium intestinal, que certaines études ont associé à l'affaiblissement des colonies d'abeilles (Higes *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que l'infection par ce parasite, couplée à une exposition à des doses sublétales d'insecticides (et notamment le fipronil), a un effet synergique sur la mortalité des abeilles (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012). Toutefois, les interactions entre l'hôte et son parasite étant mal connues, les mécanismes à l'origine de cette augmentation de la mortalité restent encore non élucidés.

Pour lutter contre les agents pathogènes, les abeilles disposent de mécanismes de défense à l'échelle individuelle qualifiée d'immunité individuelle, mais aussi de mécanismes collectifs résultant d'une coopération comportementale entre différents individus que l'on appelle immunité sociale. L'ensemble des études portant sur l'interaction *N. ceranae/A. mellifera* ne permet pas de déterminer avec exactitude les moyens de défense mis en œuvre par l'abeille pour limiter l'infection par *Nosema*, ni ceux mis en place par le parasite pour se développer efficacement. Cependant, certaines études ont montré qu'à l'échelle individuelle, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), par des cellules spécialisées dans l'immunité ou non, est un élément clé de la réponse immunitaire protectrice chez les insectes (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Huang *et al.*, 2015a). De ce fait, certaines études, *via* des analyses biochimiques et moléculaires, ont montré que les enzymes présentes dans les hémocytes (cellules de l'immunité innée des insectes circulant dans l'hémolymphe) d'abeilles infectées par *N. ceranae* impliquées dans le stress oxydant, telles que la phénol oxydase et la glucose déshydrogénase ne présentent pas une activité accrue lors d'une infection (Antúnez *et al.*, 2009). De plus, les hémocytes, ne voient pas leur nombre augmenté au cours de l'infection (Alaux *et al.* 2010). Il a également été démontré que l'expression de peptides antimicrobiens, intervenant dans la lutte contre les pathogènes, était inhibée lors d'une infection à *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Badaoui *et al.*, 2017). Le système immunitaire cellulaire et humoral circulant ne semble donc pas être efficace lors de l'infection par *N. ceranae*. La défense de l'hôte pourrait ainsi se situer au niveau de l'intestin, siège de l'infection, avec notamment une production d'ERO par les cellules intestinales localisées au site d'infection (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

De plus, comprendre dans quelles mesures le parasite génère ou non un stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre de la balance pro- et antioxydants, chez l'abeille pourrait apporter davantage d'éléments pour mieux cerner l'interaction *N. ceranae/A. mellifera*. En effet, la multiplication de *Nosema* pourrait générer un stress oxydant, en faveur ou non des pro-oxydant que sont les ERO, dans les cellules épithéliales de l'abeille où les parasites se multiplient, limitant peut être les capacités des cellules hôtes à se défendre du parasite. Cependant, bien que l'analyse des activités enzymatiques des

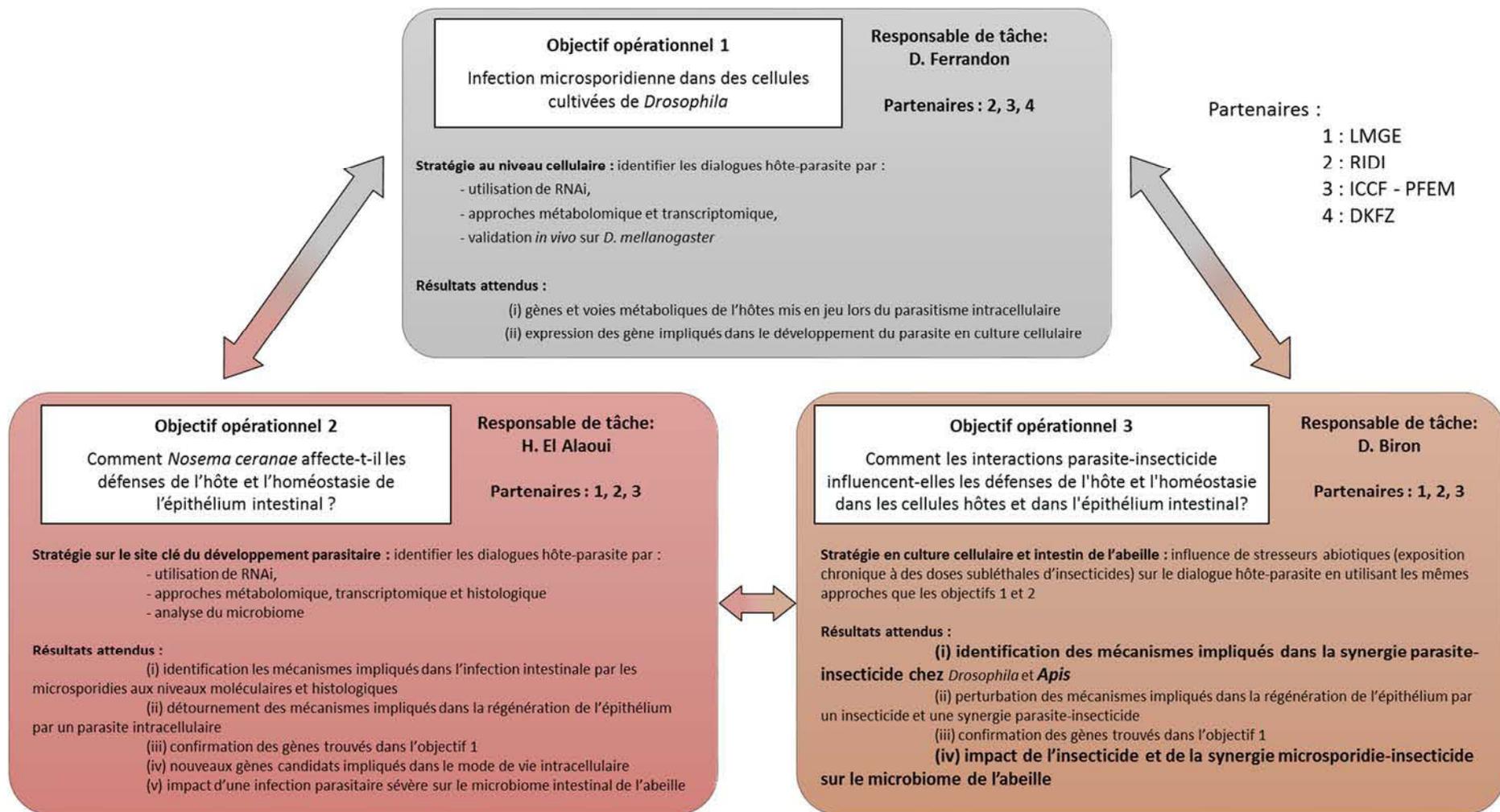


Figure 2. Présentation des différents objectifs du projet ANR BEELOSS dans lequel s'inscrit mon projet de thèse. Les différents objectifs de ma thèse s'inscrivent en partie dans l'objectif opérationnel 3, et plus particulièrement dans les lignes de résultats attendus (i) et (iv). LMGE : Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (UMR UDA CNRS 6023) ; RIDI : Réponse Immunitaire et Développement chez les insectes (Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR CNRS 9022) ; ICCF – PFEM : Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (UMR UDA CNRS 6296) - Plate-Forme d'Exploration du Métabolisme ; DKFZ : Signalisation et Génomique Fonctionnelle, Centre Allemand de Recherche sur le Cancer.

marqueurs de stress oxydant comme les antioxydants et de l'expression de leurs gènes aient été réalisées (Vidau *et al.*, 2011a; Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014), peu d'études ont abordé une approche de mesure directe du stress oxydant dans le cas de l'infection par *N. ceranae*.

Mon projet de thèse, financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, s'est inscrit dans le cadre du projet ANR BEELOSS (ANR-12-BSV3-0020) qui portait sur l'analyse de la synergie parasite/insecticide dans la perte des colonies d'abeilles à l'aide d'approches complémentaires chez *Apis mellifera* et l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* (Figure 2).

Dans ce projet, ma thèse a porté dans un premier temps sur l'étude de la réponse oxydative d'*Apis mellifera* à l'infection par *Nosema ceranae*, en présence ou non de faibles doses de l'insecticide fipronil, en cherchant à mettre en évidence la production d'ERO par les cellules intestinales, non spécialisées dans l'immunité, et en tentant de comprendre le rôle de ces ERO dans la défense contre le parasite. Parallèlement au fipronil, j'ai également étudié l'effet d'un antioxydant, la N-acétylcystéine, sur la réponse oxydative de l'intestin de l'abeille infectée ou non par le parasite.

Dans un second temps, afin d'avoir une vision plus globale l'induction de stress oxydant par les microsporidies, j'ai tenté de simplifier le modèle d'étude en utilisant un modèle de culture de cellules *in vitro*. Les cultures de cellules d'abeilles n'étant pas encore disponibles et le cycle de *N. ceranae* ne pouvant se réaliser sur d'autres types de cellules d'insectes ou de mammifères, j'ai donc travaillé sur une autre espèce microsporidienne parasite de mammifères : *Encephalitozoon cuniculi*, maintenue au laboratoire sur différentes lignées de cellules de mammifères.

Enfin, en troisième objectif, j'ai tenu à explorer la réponse du microbiote intestinal de l'abeille lors d'une infection expérimentale par *N. ceranae* et/ou d'une intoxication chronique à faibles doses par différents pesticides administrés par voie orale, cette étude constituant également l'une des tâches de l'ANR BEELOSS (Figure 2).

Chapitre 1 : Etude bibliographique

*« Notre cœur se trouve là où sont les ruches de notre connaissance.
Nous sommes toujours en route vers elles, nous qui sommes nés ailés et
collecteurs de miel de l'esprit, nous n'avons vraiment qu'une seule et unique
chose à cœur – rapporter quelque chose "chez nous" ».*

Friedrich Nietzsche

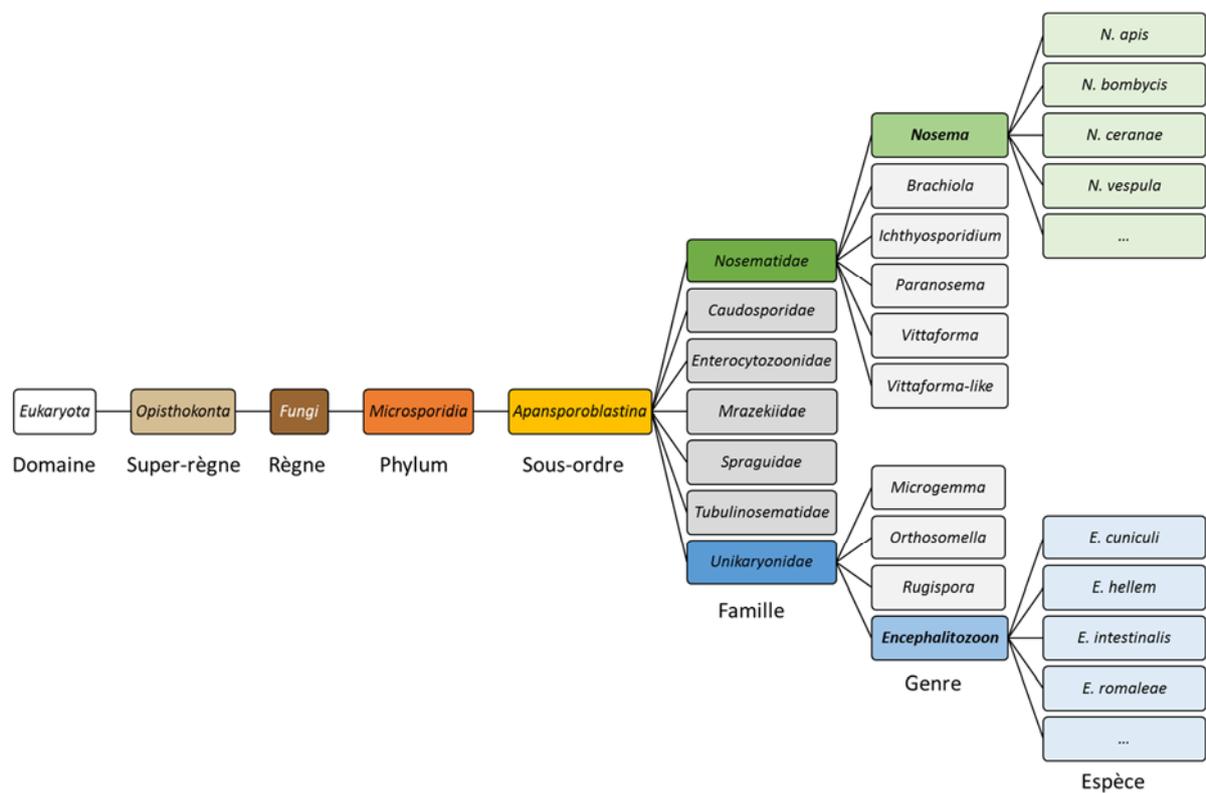


Figure 3. Phylogénie des microsporidies des genres *Encephalitozoon* et *Nosema*. Le règne des champignons compte 132 811 descendants dont le *phylum* des microsporidies (Microsporidia) auquel appartiennent 1 078 descendants. Le genre *Encephalitozoon* (en bleu) contient plusieurs espèces dont l'espèce *E. cuniculi* qui comprend elle-même 6 souches différentes (EC1, 2 et 3, EcuIII-L, EcuII-CZ et GB-M1), dont les génomes séquencés sont décrits dans l'[Annexe 1](#). Le genre *Nosema* (en vert) quant à lui est représenté par 155 descendants parmi lesquels sont notamment présentes les espèces *N. ceranae*, *apis* et *bombycis* (d'après Lifemap, NCBI version, consulté le 30/05/2017).

Les microsporidies : parasites eucaryotes uniques

1. Histoire et caractéristiques des microsporidies

L'intérêt que l'Homme porte à l'étude des parasites est souvent d'ordre médical, vétérinaire ou économique. Ainsi, les premières études qui ont porté sur les microsporidies remontent à la seconde moitié du XIX^{ème} siècle où la sériciculture dans le sud de l'Europe a été ravagée par la « pébrine », une maladie touchant le ver à soie *Bombyx mori*. Le nom pébrine a pour origine le terme « pebre » signifiant « poivre », donné du fait de la présence de petits points bruns-noirs sur le corps des vers infectés. Suite aux études menées par Cornalia en 1856, ces corpuscules noirâtres furent nommés « corpuscule de Cornalia » (Pasteur, 1870a). En 1857, le botaniste Karl Wilhelm von Nägeli identifia l'agent responsable de la pébrine comme un organisme proche de la levure et le nomma *Nosema bombycis*. Il considéra cet unicellulaire comme un champignon « schizomycète », qui était à l'époque une sorte de groupe « débarras » de bactéries ou de levures dont la classification était incertaine. Par la suite, grâce à ses travaux, Pasteur développa une méthode de grainage cellulaire efficace, consistant à séparer les œufs de *Bombyx* sains des œufs malades afin de limiter la propagation de l'agent infectieux (Pasteur, 1870a, 1870b). C'est en 1882 que les microsporidies furent reconnues comme faisant partie d'un groupe distinct des autres champignons, composé exclusivement de parasites intracellulaires obligatoires (Balbiani, 1882). En 1976, le phylum *Microspora* fût créé (Sprague & Vávra, 1977) et devenu par la suite le phylum *Microsporidia* (Figure 3).

À l'heure actuelle, ce phylum regroupe l'ensemble des microsporidies rencontrées dans l'environnement. Elles parasitent en effet, un large spectre d'hôtes, couvrant la quasi-totalité du règne animal, des invertébrés comme les insectes ou les nématodes, aux mammifères, dont l'Homme, en passant par les poissons et les crustacés (Keeling *et al.*, 2009; Corradi, 2015). C'est notamment suite à l'apparition de la pandémie du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) que les microsporidies sont apparues comme étant des pathogènes opportunistes pour l'Homme au début des années 1980, bien que les premières observations de contamination humaine furent rapportées 20 ans plus tôt (Matsubayashi *et al.*, 1959). Suite à la constatation de leurs impacts sur la santé, en particulier chez les patients immunodéprimés (sidéens, patients transplantés) (Weber *et al.*, 1994), la recherche sur les microsporidies s'est intensifiée et a été étendue à d'autres disciplines telles que la cuniculture, l'aquaculture ou encore l'apiculture, où elles ont été associées à des pertes économiques importantes au sein de ces filières.

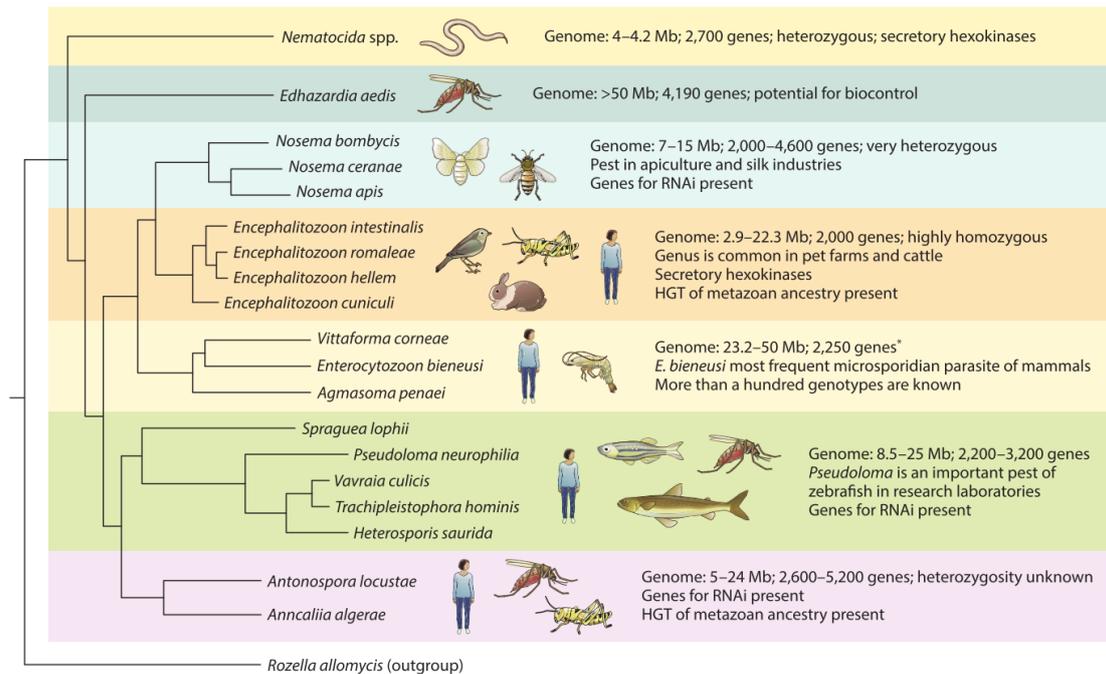


Figure 4. Phylogénie et principales caractéristiques des espèces microsporidiennes dont les génomes ont été entièrement séquencés. La reconstruction de cet arbre a été réalisée à l’aide du logiciel PhyloBayes sur la base d’alignement de 19 gènes codant pour des protéines orthologues. Le champignon *Rozella allomycis* (phylum des *Cryptomycota*) a été utilisé comme groupe externe pour la réalisation de cet arbre. Les génomes des espèces *Pseudoloma neurophilia*, *Agmasoma penaei* et *Heterosporis saurida* ne sont pas publiés. * : nombre de gènes basés uniquement sur l’espèce *Vittaforma corneae*. Les données pour les espèces *V. corneae*, *Vavraia culicis*, et *Edhazardia aedis* ont été obtenues à partir du projet de séquençage comparatif des microsporidies (<http://www.broadinstitute.org>). HGT : transfert horizontal de gènes ; RNAi : ARN interférence (d’après Corradi, 2015).

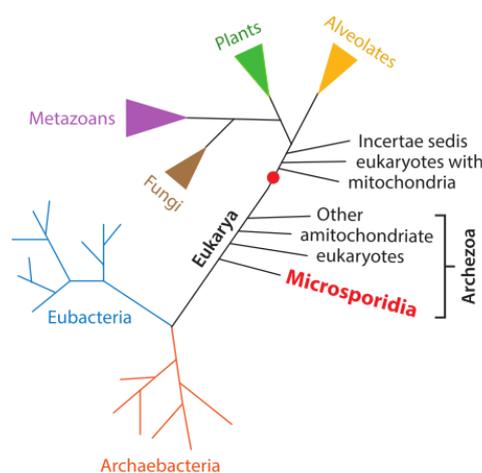


Figure 5. Taxonomie des microsporidies proposée dans les années 1980. Les microsporidies ont longtemps été classées dans un clade nommé *Archezoa* proposé par Cavalier-Smith, pour les eucaryotes qui auraient divergé avant l’endosymbiose mitochondriale. Ce clade, qui regroupait plusieurs protozoaires considérés comme « amitochondriaux » (*i.e.* dépourvus de mitochondries), s’est révélé par la suite être totalement artificiel puisque la perte des mitochondries s’est produite plusieurs fois dans différentes lignées d’eucaryotes unicellulaires. Le point rouge indique l’émergence de mitochondries selon l’hypothèse de l’endosymbiose primaire. Par la suite, à partir du milieu des années 1990, le point de vue sur la place des microsporidies dans l’arbre de vie a évolué grâce notamment aux premières phylogénies moléculaires, basées sur le séquençage de gènes codant des protéines. Ces analyses ont permis de considérer aujourd’hui les microsporidies comme des organismes apparentés aux champignons (d’après Corradi, 2015).

Dans ce chapitre, je développerai en particulier le cas de deux espèces microsporidiennes étudiées au cours de mes travaux de thèse : *Encephalitozoon cuniculi*, parasite des mammifères dont l'Homme, et *Nosema ceranae*, infectant notamment l'abeille domestique.

1.1. Caractères particuliers

Dans la phylogénie actuelle, les microsporidies sont considérées comme des organismes dérivés des champignons, appartenant au phylum *Microsporidia* (Figure 3). À ce jour, 187 genres, hébergeant environ 1 500 espèces, ont été recensés (Figure 4) (Corradi, 2015). Les microsporidies sont des eucaryotes parasites unicellulaires relativement peu complexes du fait de l'absence de mitochondries et de peroxyosomes, et de la présence d'un appareil de Golgi non structuré en dictyosomes (Beznoussenko *et al.*, 2007). Les microsporidies possèdent cependant différentes caractéristiques procaryotiques telles que des ribosomes de type 70S, composés d'ARN ribosomiaux (ARNr) 16S et 23S. L'ARNr 23S présente néanmoins la particularité d'être fusionné à un ARNr 5,8S eucaryotique. Enfin, les microsporidies sont également caractérisées par des génomes très compacts qui sont généralement de taille extrêmement réduite (Sharma *et al.*, 2014) (Annexe 1). L'absence de mitochondries a d'ailleurs contribué à l'idée que les microsporidies devaient être considérées comme des eucaryotes primitifs « amitochondriaux ». Elles furent ainsi classées dans les années 1980 dans le clade des *Archezoa* (Figure 5) (Corradi, 2015) où figuraient d'autres organismes ne possédant pas de mitochondries (*e.g.* *Entamoeba*, *Giardia*, *Trichomonas*), aujourd'hui phylogénétiquement distincts les uns des autres (Keeling & Fast, 2002).

Cependant, la preuve phylogénétique que la microsporidie est étroitement liée aux champignons a rendu impossible la détermination d'un ancêtre dépourvu de mitochondries, contestant ainsi l'existence des *Archezoa* (Keeling *et al.*, 2009). Ceci remet en cause l'origine de l'absence de vraies mitochondries, considérant plutôt une perte de l'organite qu'une absence totale de celui-ci au cours de l'évolution de ces organismes amitochondriaux. En outre, la découverte d'organites semblant dériver d'une mitochondrie ancestrale comportant des protéines chaperonnes mitochondriales comme Hsp70 ou Hsp60 (respectivement impliquées dans la machinerie d'import des protéines et dans leur repliement), contribue au rejet de l'idée que les microsporidies constituent un groupe primitif d'organismes amitochondriaux.

Ces organites apparentés aux mitochondries, décrits sous le nom d'hydrogénosomes (*e.g.* *Trichomonas*), de mitochondries anaérobies (*e.g.* *Fasciola*, *Ascaris* ou *Euglena*) ou productrices d'hydrogène (*e.g.* *Blastocystis*), et de mitosomes (*e.g.* *Entamoeba* et *Giardia*), possèdent des propriétés particulières (Figure 6). Comme les mitochondries, ces organites ont généralement un contenu enzymatique, impliqué dans les voies métaboliques de production d'énergie, variable selon

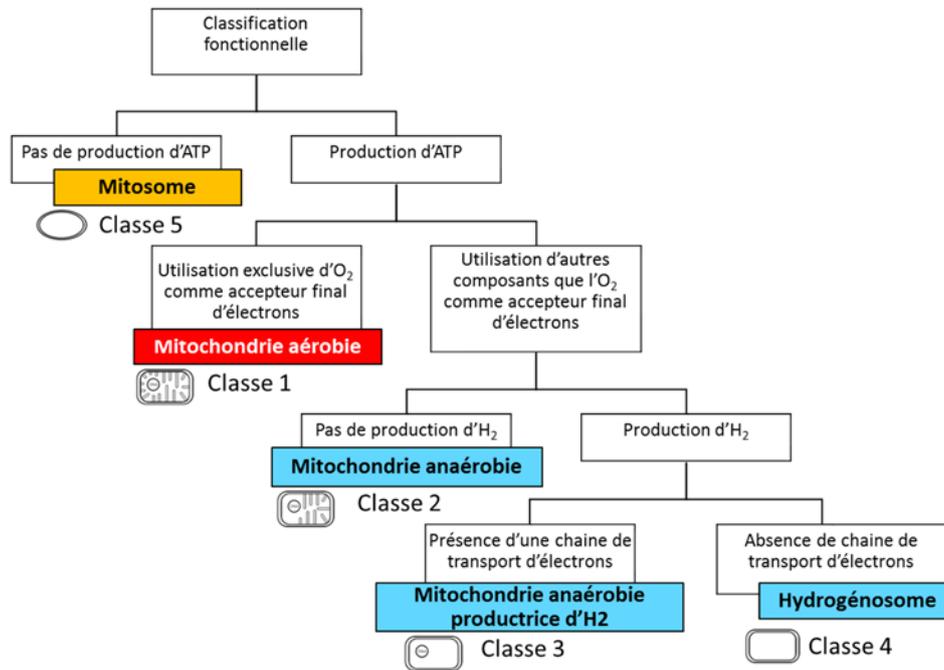


Figure 6. Classification fonctionnelle des organites d'origine mitochondriale. Cette classification propose l'existence de 5 classes d'organites de type mitochondrial, parmi lesquels 4 sont impliqués dans la production d'énergie. **Classe 1** : la mitochondrie aérobie (la plus « classique ») utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. **Classe 2** : la mitochondrie anaérobie utilise quant à elle, un accepteur d'électrons produit de façon endogène, comme le fumarate en remplacement de l'oxygène. **Classe 3** : la mitochondrie productrice d'hydrogène (H₂) possède une hydrogénase et utilise les protons comme accepteurs d'électrons. **Classe 4** : le mitosome a la particularité de ne pas produire d'ATP. Le rouge indique que l'oxygène est consommé au cours de la production d'ATP, le bleu que la production d'ATP est réalisée sans oxygène et le jaune que l'organite n'est pas impliqué dans la production d'ATP (d'après Müller *et al.*, 2012).

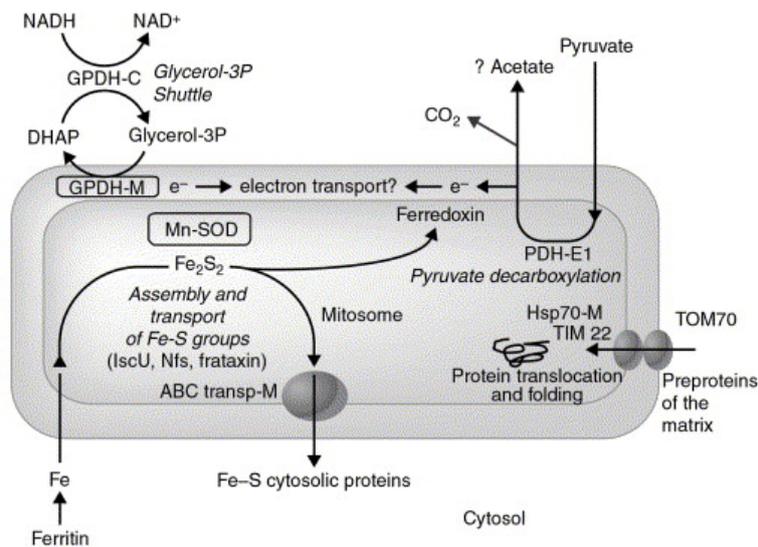


Figure 7. Représentation schématique du mitosome chez les microsporidies. Cet organite d'origine mitochondriale présente une morphologie très simple et n'a conservé que très peu de fonctions de la mitochondrie. Il est délimité par une double membrane au sein de laquelle différentes structures telles qu'une glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (GPDH) et certaines sous-unités des complexes mitochondriaux des membranes interne et externe, impliqué dans la translocation des protéines (TIM22 et TOM70), sont retrouvées. Le rôle principal de cet organite cryptique serait l'assemblage des centres fer/soufre (Fe/S). La biogénèse des complexes Fe/S aboutirait à la formation d'une ferrédoxine active, protéine participant au transport des électrons (d'après Vivarès *et al.*, 2002).

l'organite et l'organisme considérés, correspondant à une adaptation des organismes vis-à-vis de l'environnement dans lequel ils évoluent ou de leur mode de vie. Par exemple le mitosome des microsporidies est adapté à leur mode de vie parasitaire (Müller *et al.*, 2012).

Délimités par une double membrane, les mitosomes ne présentent cependant pas de crêtes et sont de plus petite taille que celle des mitochondries, soit environ 50 à 500 nm contre environ 1 µm selon des organismes considérés (Roussel, 2011). Le nombre de mitosomes peut varier en fonction des espèces, notamment au sein des microsporidies, comme par exemple chez *Trachipleistophora hominis* qui en possède une trentaine contre moins d'une dizaine chez *E. cuniculi* (Hjort *et al.*, 2010). Les mitosomes ne possèdent pas de génome et ont perdu de nombreuses fonctions caractéristiques des mitochondries comme l'absence des complexes impliqués dans la chaîne de phosphorylation oxydative, l'absence de cycle de Krebs, et même, l'absence de production d'énergie.

En revanche, il a été montré que les mitosomes jouent un rôle majeur dans la biosynthèse des centres fer-soufre (Fe/S) et leur incorporation dans les protéines Fe/S fonctionnelles, celles-ci étant souvent impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction (Vávra & Lukeš, 2013). Cette activité d'assemblage des centres Fe/S au sein des mitosomes a été démontrée chez les espèces *T. hominis* et *E. cuniculi* (Goldberg *et al.*, 2008) (Figure 7). Enfin, l'absence de gènes codant pour des transporteurs membranaires, les MCF (*Mitochondrial Carrier Family*), permettant le passage d'ATP et d'ADP au travers de la membrane interne de la mitochondrie, a été observée dans les mitosomes (Katinka *et al.*, 2001). Ils possèdent néanmoins d'autres transporteurs de nucléotides d'origine bactérienne appelés NTTs (*Nucleotide Transporters*) qui sont des translocases ATP/ADP (Tsaousis *et al.*, 2008).

Contrairement aux mitochondries, les mitosomes sont incapables de produire leur propre énergie en quantité suffisante, d'où la nécessité d'effectuer cet apport depuis l'extérieur pour le métabolisme cellulaire, afin de compléter l'apport d'ATP généré par la microsporidie *via* la glycolyse. Tsaousis et collaborateurs ont ainsi montré que, parmi les quatre transporteurs d'ATP de la famille des NTTs présents chez *E. cuniculi*, trois d'entre eux étaient retrouvés à la surface du parasite lorsque le parasite se développe dans la cellule hôte, le quatrième étant localisé dans la membrane du mitosome. Ceci suggère la présence d'une réserve d'ATP en provenance de l'hôte dans le cytosol du parasite, à disposition du mitosome (Tsaousis *et al.*, 2008). Cette forte dépendance énergétique des microsporidies vis-à-vis de l'hôte est un autre trait caractérisant ces parasites. Une récente étude publiée par Freibert et collaborateurs a mis en lumière l'origine évolutive des protéines Fe/S et des voies métaboliques impliquées. Leurs résultats montrent une origine bactérienne des voies d'assemblage des protéines Fe/S, mais aussi archéenne en ce qui concerne les protéines Fe/S cytosoliques et nucléaires, appuyant la thèse de l'origine chimérique des eucaryotes (Freibert *et al.*, 2017).

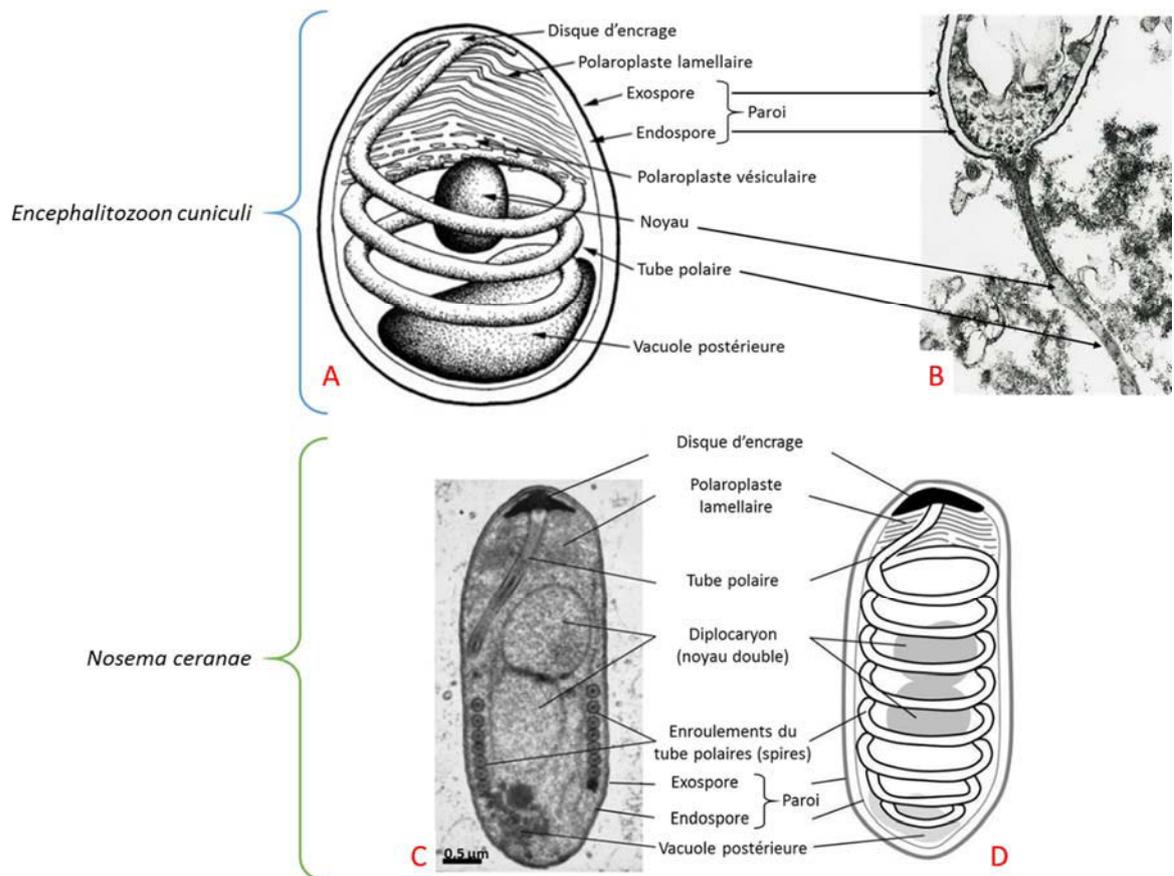


Figure 8. Structure des spores microsporidiennes d'*Encephalitozoon cuniculi* (A-B) et de *Nosema ceranae* (C-D). Schémas représentatifs (A) de l'ultrastructure d'une spore d'*E. cuniculi* (d'après Keeling and Fast, 2002) et (D) de *N. ceranae*. Une photographie en microscopie électronique à transmission de chacune des spores est donnée : (B) coupe d'une spore d'*E. cuniculi* montrant le passage du sporoplasme au travers du tube polaire dévaginé (Cliché Delbac F., communication personnelle), et (C) coupe d'une spore de *N. ceranae* montrant les différentes structures intracellulaires et notamment les sections du tube polaire enroulé (d'après Aufauvre, 2013).

Le matériel génétique des microsporidies peut être regroupé au sein d'un seul noyau (monocaryon), comme c'est le cas chez *E. cuniculi*, ou de deux noyaux accolés (diplocaryon), e.g *N. ceranae* (Figure 8). La taille des génomes microsporidiens (Annexe 1) varie entre 2,2 Mpb pour *Encephalitozoon romalae* et *Encephalitozoon intestinalis* (Pombert *et al.*, 2012) et 51,4 Mpb chez *Edhazardia aedis*, parasite des moustiques (Desjardins *et al.*, 2015). Généralement, les génomes sont relativement petits, plus petits que de nombreux génomes bactériens. *E. cuniculi*, dont plusieurs souches ont été séquencées, possède un génome inférieur à 3 Mpb (Katinka *et al.*, 2001; Peyretailade *et al.*, 2009; Pombert *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2016), quant à celui de *N. ceranae*, il est de 7,9 Mpb (Cornman *et al.*, 2009), bien que sa taille ait été estimée à 5,7 Mpb par Pelin et collaborateurs (Pelin *et al.*, 2015).

Au cours de leur cycle de développement, les microsporidies se présentent sous deux formes : la forme végétative sous laquelle elles vont croître et se multiplier au sein d'une cellule hôte, et la spore qui leur permet d'être disséminées dans l'organisme puis l'environnement pour y survivre jusqu'au prochain cycle de multiplication.

1.2. La spore microsporidienne

La plupart du temps ovales, mais aussi parfois sphériques ou filiformes, les spores ont une taille qui varie généralement de 1 μm pour *Enterocytozoon bieneusi* à quelques micromètres (Sharma *et al.*, 2014). Les spores d'*E. cuniculi* mesurent environ 2,2 x 1,2 μm (Taupin, 2006), contre 4,4 x 2,2 μm pour celles de *N. ceranae* (Chen *et al.*, 2009b). L'enveloppe de la spore comprend une membrane plasmique qui est recouverte d'une paroi rigide lui conférant son caractère de résistance au milieu extérieur hostile en conservant une pression osmotique interne élevée. Ainsi, les spores d'*E. cuniculi* peuvent survivre à un pH acide de 4 ou basique de 9 durant 24h, et conservent leur pouvoir infectieux suite à un traitement à 56°C pendant 1h ou après une conservation à 4°C pendant 2 ans (Koudela *et al.*, 1999). Les spores de *N. ceranae* quant à elles, peuvent rester viables suite à des traitements thermiques de 35 et 60°C durant une heure à un mois. *A contrario*, elles sont sensibles aux températures négatives puisqu'une diminution de la capacité infectieuse est observée après congélation à -20°C (Fenoy *et al.*, 2009). De plus, une exposition des spores de *N. ceranae* aux UV entraîne une perte de leur viabilité, de 50% après 5 min de traitement à 100% après 45 min d'exposition (Zheng *et al.*, 2014). Ces expériences soulignent la capacité des spores à résister à des conditions environnementales difficiles (température, pH) bien que cela soit difficile de conserver la totalité des spores viables. C'est la constitution de la paroi sporale qui confère à la spore son caractère de résistance.

En effet, la paroi des spores microsporidiennes est constituée de deux couches : l'exospore et l'endospore (Figure 8). L'exospore, couche la plus externe, est principalement constituée de protéines,

Tableau 1. Protéines du tube polaire (PTP) chez différentes espèces microsporidiennes.

✓ : séquence complète ; ! séquence partielle ; × : séquence non déterminée (d'après Weiss *et al.*, 2014).

Espèce microsporidienne	PTP1	PTP2	PTP3	PTP4	PTP5
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Encephalitozoon hellem</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Encephalitozoon romaleae</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Antonospora locustae</i>	✓	✓	!	✓	✓
<i>Paranosema grylli</i>	✓	✓	!	✓	!
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	×	✓	✓	×	×
<i>Trachipleistophora hominis</i>	×	✓	✓	!	✓
<i>Nosema ceranae</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Nosema bombycis</i>	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Anncaliia algerae</i>	✓	!	✓	✓	✓
<i>Vittaforma corneae</i>	×	✓	!	✓	✓
<i>Vavraia culicis floridensis</i>	×	✓	✓	✓	✓
<i>Edhazardia aedis</i>	×	✓	✓	✓	✓
<i>Nematocida parisii</i>	×	✓	✓	×	×
<i>Octosporea bayeri</i>	×	×	!	!	✓

les SWP (*Spore Wall Proteins*) et de glycoprotéines. Une quinzaine de SWP ont été identifiées chez différentes espèces d'*Encephalitozoon* ainsi que chez *Nosema bombycis* (Weiss *et al.*, 2014). L'endospore, qui repose sur la membrane plasmique, est de plus grande épaisseur et majoritairement formée de chitine associée à des protéines, les EnP (*Endospore proteins*), qui permettent d'établir des ponts avec l'exospore et la membrane plasmique (Weiss *et al.*, 2014). Les protéines de la paroi sporale pourraient être en partie impliquées dans le processus d'infection des microsporidies, en particulier dans les processus d'adhésion de la spore aux glycosaminoglycanes de la surface de la cellule hôte. Cependant, seule la protéine EnP1, présente chez les *Encephalitozoon*, semble jouer un rôle dans les mécanismes d'établissement de pont disulfures entre la spore et la cellule hôte. EnP1 ne semble d'ailleurs pas exprimée uniquement au niveau de l'endospore, mais également au niveau du disque d'ancrage et à la surface de l'exospore chez les espèces *E. intestinalis* et *E. cuniculi* (Southern *et al.*, 2007).

La spore renferme un appareil invasif appelé aussi « appareil d'extrusion », qui est formé de quatre éléments (Figure 8) :

- (i) le disque d'ancrage, ou capuchon polaire, situé au pôle antérieur de la spore ;
- (ii) le tube polaire, enroulé dans le sporoplasme (*i.e.* contenu de la spore), et dont le nombre de tours, considéré comme un critère d'identification des espèces, varie entre 4 et 30. Par exemple, *E. cuniculi* présente 5 à 6 tours de spires sur une seule rangée, tandis que *N. ceranae* en présente 18 à 23 tours sur deux rangées (Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009a). Selon l'espèce microsporidienne considérée, la taille du tube polaire varie entre 50 et 500 µm de longueur, avec un diamètre de 0,1-0,2 à 6 µm lors du passage du sporoplasme (Weiss *et al.*, 2014) ;
- (iii) le polaroplaste lamellaire, caractérisé par un empilement de structures membranaires et qui formeraient la future membrane plasmique du sporoplasme libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le polaroplaste lamellaire se distingue du polaroplaste vésiculaire qui correspond à l'appareil de Golgi de la microsporidie ;
- (iv) la vacuole postérieure, qui semble jouer un rôle clé dans la décharge du sporoplasme lors de la germination de la spore.

Depuis la première description du tube polaire des microsporidies il y a environ 125 ans (Thélohan, 1894), de nombreuses études ont permis de caractériser ses principaux composants. Cinq protéines du tube polaire (PTP) ont ainsi été identifiées à ce jour chez différentes espèces microsporidiennes (PTP1 à PTP5) (Delbac *et al.*, 1998, 2001; Peuvel *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2014) (Tableau 1).

Plusieurs études ont contribué à l'hypothèse selon laquelle les PTP seraient impliquées dans le processus d'extrusion du tube polaire. Les PTP seraient en effet, déposés sur la pointe croissante du tube après la rupture du disque d'ancrage et subiraient une modification de leur potentiel redox suite

Tableau 2. Principales caractéristiques des microsporidies *Encephalitozoon cuniculi* et *Nosema ceranae*.

Caractéristiques	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Nosema ceranae</i>
Taille de la spore	2,2 x 1,2 µm (Taupin, 2006)	4,4 x 2,2 µm (Chen <i>et al.</i> , 2009a)
Tours de spires	5 à 6 tours (Taupin, 2006)	18 à 23 tours (Fries <i>et al.</i> , 1996; Chen <i>et al.</i> , 2009a)
Type de noyau	Monocaryon	Diplocaryon
Taille du génome nucléaire	2,5 Mpb (Katinka <i>et al.</i> , 2001; Peyretailade <i>et al.</i> , 2009)	5,7 à 7,9 Mpb (Cornman <i>et al.</i> , 2009; Pelin <i>et al.</i> , 2015)
Interface hôte-parasite	Vacuole parasitophore	Contact direct avec le cytoplasme de la cellule hôte
Hôtes	Mammifères	Certains Hyménoptères
Type de cellules infectées	Epithéliales, endothéliales, macrophages	Epithéliales intestinales

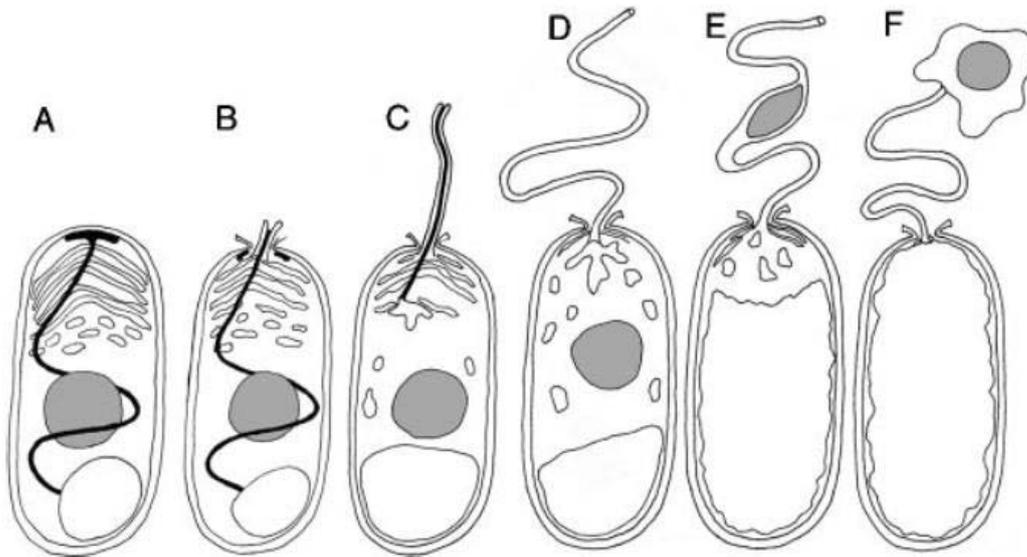


Figure 9. Les différentes étapes de la dévagination du tube polaire et de la libération du sporoplasme. (A) Spore mature « dormante » présente dans l'environnement contenant un tube polaire enroulé dans le sporoplasme. Le tube polaire est représenté en noir et le noyau en gris. (B) Gonflement de la vacuole postérieure et rupture du disque d'ancrage au pôle antérieur de la spore. (C et D) Dévagination (sortie) du tube polaire à la manière d'un « doigt de gant inversé ». (E) Passage du contenu cellulaire (sporoplasme et noyau) au travers du tube polaire. (F) La totalité du sporoplasme est déversée dans le cytoplasme de la cellule hôte. La membrane plasmique délimitant le sporoplasme libéré a pour origine des membranes du polaroplaste lamellaire présent au pôle apical de la spore (d'après Keeling and Fast, 2002).

à l'exposition à l'environnement extérieur. Cette modification du potentiel redox entre l'intérieur du tube polaire et l'extérieur de la spore pourrait déclencher la formation de ponts disulfures dans les PTP, favorisant une modification de configuration des PTP et provoquant ainsi le déploiement du tube polaire, jusqu'à ce que la réserve de PTP soit épuisée (Weiss *et al.*, 2014). Une étude plus récente indique que la protéine PTP4 jouerait un rôle dans l'attachement du tube à la cellule hôte lors de l'invasion en interagissant avec le récepteur à la transferrine de cette dernière (Han *et al.*, 2017).

Ainsi, les caractères structuraux et organisationnels des microsporidies, en particulier sous leur forme sporale, sont très caractéristiques d'une espèce à l'autre et peuvent servir de critères de différenciation et d'identification des espèces, en complément des analyses de phylogénie moléculaire. Le [tableau 2](#) répertorie les principales caractéristiques d'*E. cuniculi* et de *N. ceranae*, les deux espèces étudiées au cours de ma thèse.

2. Cycle de développement des microsporidies

Comme pour de nombreux organismes parasites, la multiplication des microsporidies nécessite que les spores survivent dans l'environnement afin de rencontrer un organisme hôte et d'accéder aux cellules cibles. Les parasites vont alors proliférer dans le but de produire de nouvelles spores qui seront libérées dans l'environnement, afin d'infecter un nouvel hôte pour débiter un nouveau cycle. Chaque étape est donc un obstacle que le parasite doit surmonter pour survivre.

L'un des moyens dont disposent certaines microsporidies pour lever quelques un de ces verrous, notamment celui de la contamination d'un nouvel hôte, est la transmission verticale, c'est-à-dire une transmission à la descendance, qui s'oppose à la transmission horizontale qui s'effectue d'un individu à un autre. En effet, l'existence d'une transmission verticale a été démontrée chez certaines espèces microsporidiennes telles que *Nosema granulosis* ou *Dictyocoela* spp., capables d'infecter le tissu ovarien de plusieurs espèces d'Amphipodes comme les Gammares (Terry *et al.*, 2004; Dubuffet *et al.*, 2013).

Le cycle de développement des microsporidies peut varier d'un genre à l'autre, et, tandis que la plupart des espèces ont un cycle parasite monoxène (*i.e.* un seul hôte), certaines ont un cycle partagé entre plusieurs hôtes (*i.e.* cycle hétéroxène). C'est notamment le cas des genres *Amblyospora*, *Hyalinocysta* et *Parathelohania* qui parasitent les moustiques, et qui ont besoin d'un copépode comme hôte intermédiaire obligatoire (Solter, 2014). Deux espèces microsporidiennes ont particulièrement été étudiées afin de mieux comprendre le caractère particulier de ces cycles microsporidiens à plusieurs hôtes : (i) *Amblyospora connecticus*, dont la spore peut être sous 3 formes différentes selon son cycle de vie alterné entre un hôte définitif, le moustique *Ochlerotatus cantator* (anciennement *Aedes cantator*), et un hôte intermédiaire, le copépode *Acanthocyclops vernalis* (Dunn & Smith, 2001) ;

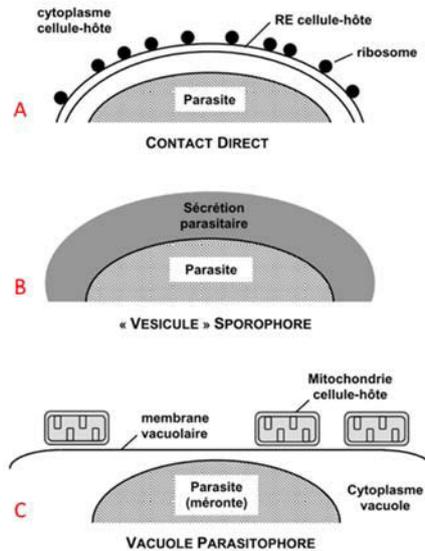


Figure 10. Principaux types d'interfaces microsporidies-cellules hôtes. (A) Le développement du parasite au contact direct du cytoplasme de la cellule-hôte est assez répandu chez les microsporidies, comme c'est le cas de *Nosema ceranae*. (B) Chez certaines espèces, les stades parasitaires peuvent être entourés d'une sécrétion d'origine parasitaire appelée « vésicule sporophore ». (C) D'autres microsporidies, comme *Encephalitozoon cuniculi*, se développent au sein d'une vacuole parasitophore qui aurait pour origine une partie de la membrane plasmique de la cellule hôte (d'après Taupin, 2006).

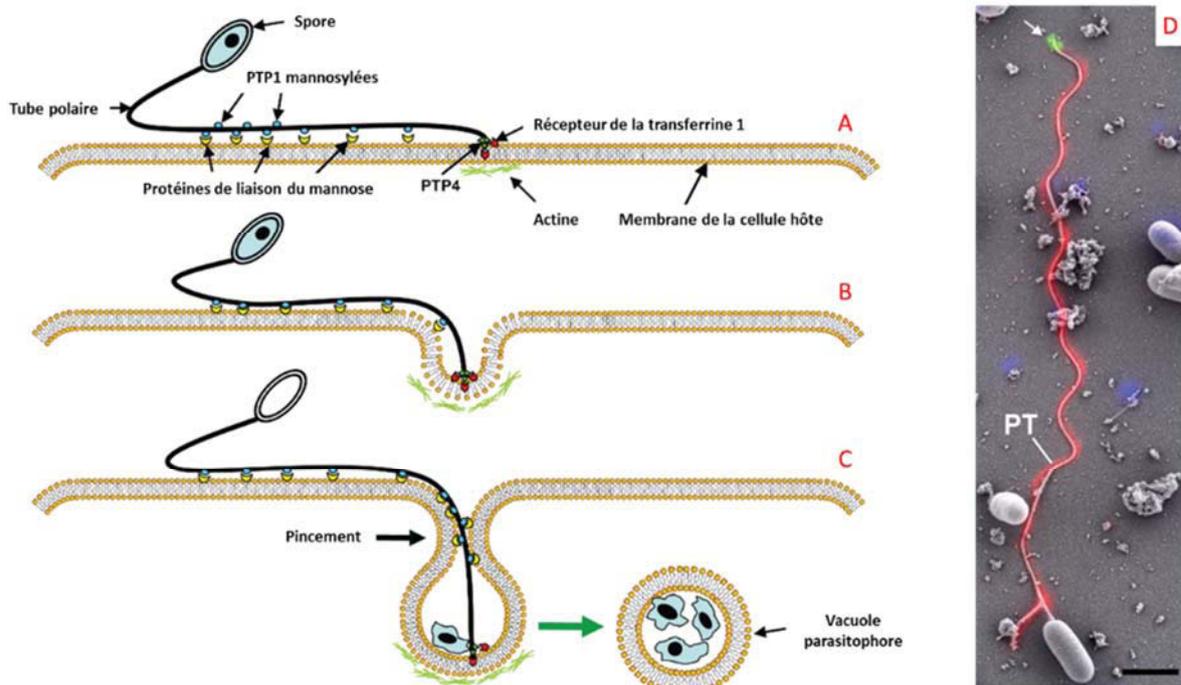


Figure 11. Modèle du mécanisme d'invasion et de formation de la vacuole parasitophore. (A) Les protéines du tube polaire PTP1 (marquées en rouge sur le cliché en D grâce à un anticorps anti-PTP1) interagissent avec des protéines de liaison au mannose présentes à la surface de la cellule hôte. Le tube polaire peut ainsi adhérer à la cellule et former une « synapse d'invasion » en poussant la membrane plasmique. (B) Les épitopes de la protéine PTP4 (*Encephalitozoon hellem* sur le cliché D) exposés à l'extrémité du tube polaire dévaginé (marquée en vert sur le cliché en D grâce à un anticorps anti-PTP4, flèche blanche) interagissent à leur tour avec le récepteur de la transferrine (Tfr1) à la surface de la cellule hôte, provoquant ainsi une signalisation conduisant notamment à l'endocytose de la membrane cellulaire de l'hôte médiée par la clathrine. (C) La fermeture de la synapse, due aux interactions de PTP1 de part et d'autre du tube, ainsi que l'implication de l'actine de l'hôte, permet la formation d'un micro-environnement qui protège le sporoplasme microsporidien libéré et la formation de la vacuole parasitophore (d'après Han *et al.*, 2017).

(ii) *Hyalinocysta chapmani* qui débute son cycle dans le copépode *Orthocyclops modestus* et le termine chez le moustique *Culiseta melanura* (Andreadis & Vossbrinck, 2002).

Les microsporidies sont caractérisées par un processus d'invasion original, unique dans le monde vivant. En effet, une augmentation de la pression osmotique intrasporale, induite par un changement environnemental de nature chimique ou physique, entraîne un gonflement du polaroplaste et une rupture au niveau du disque d'ancrage. Le tube est alors expulsé hors de la spore en moins de 2 secondes à grande vitesse (qui augmenterait à mesure que le tube se déroule et atteindrait 105 $\mu\text{m/s}$) et avec une force suffisante pour percer le plasmalemme de la cellule hôte (Weiss *et al.*, 2014). Ce phénomène est qualifié de processus « d'extrusion » ou de « dévagination » du tube polaire¹ (Figure 9). C'est par l'intermédiaire de ce tube protecteur qu'est déversé le contenu de la spore, appelé sporoplasme, directement en contact ou non avec le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 10).

Le mécanisme par lequel le tube polaire reconnaît ses cellules hôtes n'est pas encore bien décrit. La première hypothèse fut que le tube polaire perceait la membrane de la cellule hôte pour injecter le sporoplasme, mais d'autres recherches supposent que l'internalisation du sporoplasme se ferait par endocytose et nécessiterait l'intervention de protéines du cytosquelette de la cellule hôte telles que l'actine (Weiss *et al.*, 2014). Des recherches ont également montré que les protéines du tube polaire, dont certaines sont glycosylées, pouvaient interagir avec des protéines de liaison au mannose à la surface de la membrane de la cellule hôte pour se fixer puis invaginer la membrane de l'hôte afin de créer un microenvironnement protecteur pour le sporoplasme libéré. Ce processus a été décrit chez *Encephalitozoon hellem*, qui comme les autres espèces du même genre, est caractérisée par un cycle de développement à l'intérieur d'une vacuole parasitophore (Han *et al.*, 2017) (Figure 11). Cette vacuole serait issue de la membrane plasmique de la cellule hôte lors de l'endocytose du sporoplasme libéré. La formation de la vacuole semble extrêmement rapide, estimée à moins de 2 secondes après l'extrusion du sporoplasme (Rönnebäumer *et al.*, 2008). Chez *Trachipleistophora hominis*, la vacuole parasitophore se forme seulement après la phase de multiplication, lors de la maturation des spores (Watson *et al.*, 2015). Concernant les espèces du genre *Nosema*, le sporoplasme est *a contrario* libéré directement dans le cytosol de la cellule hôte et l'ensemble du cycle de développement se déroule au contact de ce dernier.

Après l'invasion, le cycle de vie se déroule en deux principales étapes intracellulaires. Durant la première phase nommée mérogonie, les mérontes se multiplient avant de se différencier, dans une seconde phase dite de « sporogonie », en sporontes, puis en sporoblastes et enfin en spores matures.

¹ Une récente vidéo montrant le déploiement du tube polaire de la microsporidie *Edhazardia aedis*, parasite de moustique, a été publiée par Troemel et Becnel en 2015. La vidéo est disponible sur le lien suivant : <http://microbe.swu.edu.cn/media/video/Polar-tube-firing-of-microsporidian-Edhazardia-aedis/bca03583744a536ebb3f7922b8a5fac0>

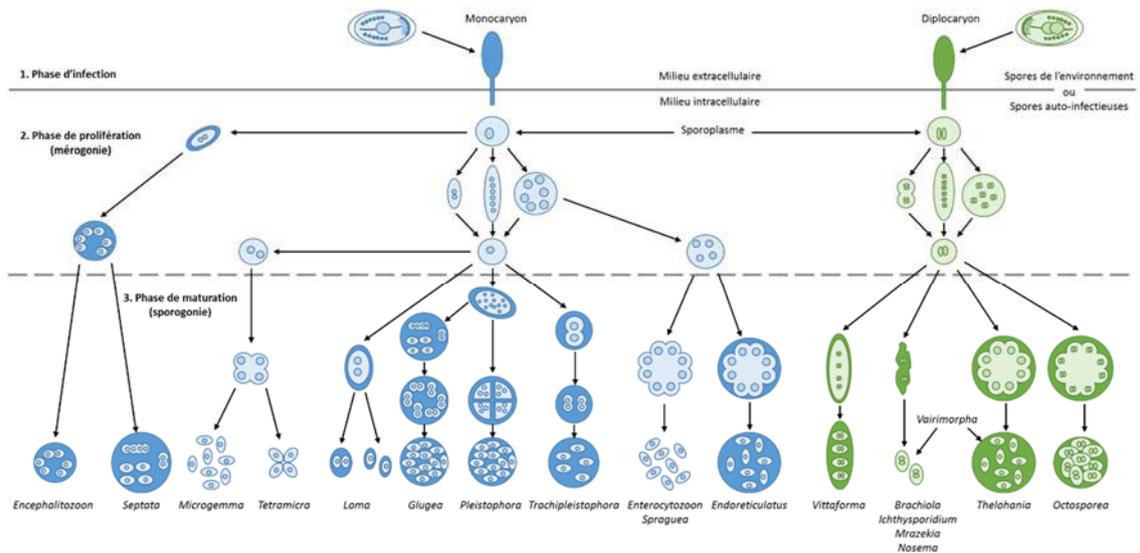


Figure 12. Représentation schématique des cycles de vie de différents genres microsporidiens. Le développement des microsporidies se déroule en trois étapes : **1.** l'infection (ou invasion) permet de transférer le contenu de la spore (sporoplasme) dans le cytoplasme de la cellule hôte ; **2.** la mérogonie durant laquelle les parasites se multiplient ; **3.** la sporogonie, étape au cours de laquelle les parasites subissent des étapes de maturation (mise en place de l'appareil invasif et de la paroi) pour former de nouvelles spores. La figure illustre la diversité observée dans les phases de prolifération et de maturation entre les genres microsporidiens (d'après Cali et Takvorian, 2014 and Mehlhorn, 2015).

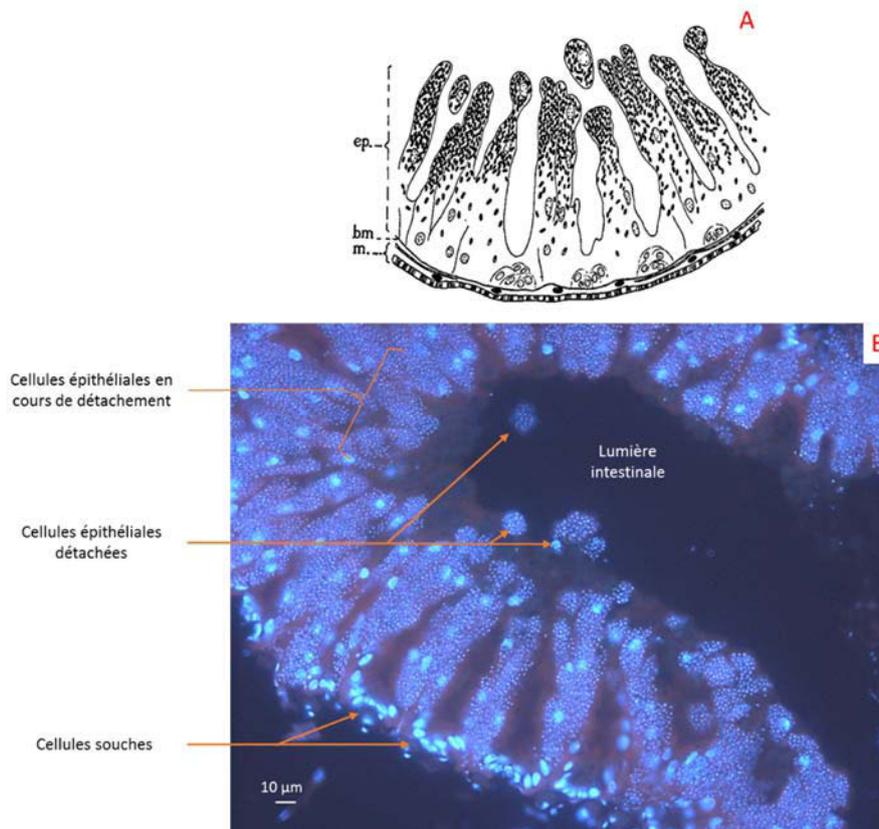


Figure 13. Détachement des cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille infectée par *Nosema* sp. (A) : schéma de l'intestin d'une abeille infectée par *Nosema*, supposé *N. apis* à l'époque. ep : épithélium intestinal contenant les parasites (grains noirs) ; bm : membrane basale ; m : muscle. (White, 1919). (B) : photographie d'une coupe longitudinale d'un intestin d'abeille parasité par *N. ceranae*, 14 jours post-infection. Les noyaux des cellules et des différents stades parasitaires sont marqués au DAPI (Cliché Diogon M., communication personnelle). Le détachement dans la lumière du tube digestif de cellules remplies de parasites apparaît clairement sur le cliché qui confirme les observations faites il y a presque un siècle. L'absence de marquage de spores dans les cellules souches suggère également que les parasites n'infectent pas ces dernières.

Ces étapes, bien qu'elles soient communes à toutes les espèces microsporidiennes, peuvent varier en fonction des genres considérés (Cali & Takvorian, 2014) (Figure 12).

À la fin du cycle, les spores nouvellement formées semblent se propager au sein du tissu infecté en passant de la cellule initialement contaminée (infection primaire) à une cellule voisine (infection secondaire). La dissémination dans le milieu extracellulaire, quant à elle, aurait lieu par lyse des cellules parasitées. Les spores nouvellement formées et libérées migreraient ensuite jusqu'à une sortie de l'organisme pour être déversées dans l'environnement. Cependant, l'hypothèse de la dissémination par détachement des cellules infectées est envisagée. Par exemple, *N. ceranae* qui se multiplie dans les cellules épithéliales de l'intestin de son hôte, profiterait du renouvellement naturel du tissu intestinal pour être évacué vers la sortie de l'organisme. En effet, le développement de l'épithélium intestinal se fait depuis les cellules basales (*i.e.* les cellules souches) qui se divisent et se différencient en cellules épithéliales. Au fur et à mesure du développement, les cellules migrent progressivement du pôle basal de l'intestin, vers le pôle apical, c'est-à-dire la lumière intestinale. Les cellules apicales de l'épithélium sont ensuite délestées dans la lumière intestinale, en se détachant progressivement du reste de l'épithélium. Ce phénomène n'est pas différent lorsque les cellules sont infectées par les microsporidies (Figure 13) et il est très probable que le parasite soit ainsi évacué vers l'ampoule rectale avant d'être disséminé dans l'environnement lors des vols de propretés que les abeilles effectuent pour déféquer hors de la ruche.

12

3. *Encephalitozoon cuniculi*, une microsporidie bien connue

Les microsporidies du genre *Encephalitozoon* sont des parasites des vertébrés dont l'Homme. À ce jour, plusieurs espèces sont référencées (NCBI, Lifemap) comme appartenant à ce genre, dont les plus connues et les plus étudiées sont : *E. cuniculi* ; *E. hellem* ; *E. intestinalis* et *E. romalae* (Figure 3). C'est l'espèce *E. cuniculi*, disponible au laboratoire dont le cycle est détaillé Figure 14, qui a fait l'objet d'une partie de l'étude de cette thèse. Cette espèce microsporidienne fut le premier parasite eucaryote dont le génome a été entièrement séquencé (Katinka *et al.*, 2001). Identifié initialement chez le lapin, sauvage ou domestique, *E. cuniculi* peut également se développer chez les muridés, le renard (Meredith *et al.*, 2015), le chat (Benz *et al.*, 2011; Künzel *et al.*, 2014; Tsukada *et al.*, 2016), le chien (Nell *et al.*, 2015) ou encore le cheval (Wagnerová *et al.*, 2012). Il est transmissible aux primates dont l'Homme, et peut créer des troubles digestifs et neurologiques, notamment chez les personnes immunodéprimées (Figure 15). Décrit pour la première fois en 1923 chez le lapin par Levaditi et ses collaborateurs (Levaditi *et al.*, 1923), *E. cuniculi* fût associé par erreur à différentes maladies comme la rage avec la formation de corps de Négri et a notamment été assimilé à l'embranchement des *Nosema* (*Nosema cuniculi*), avant d'être de nouveau affilié à l'embranchement des *Encephalitozoon* dans les

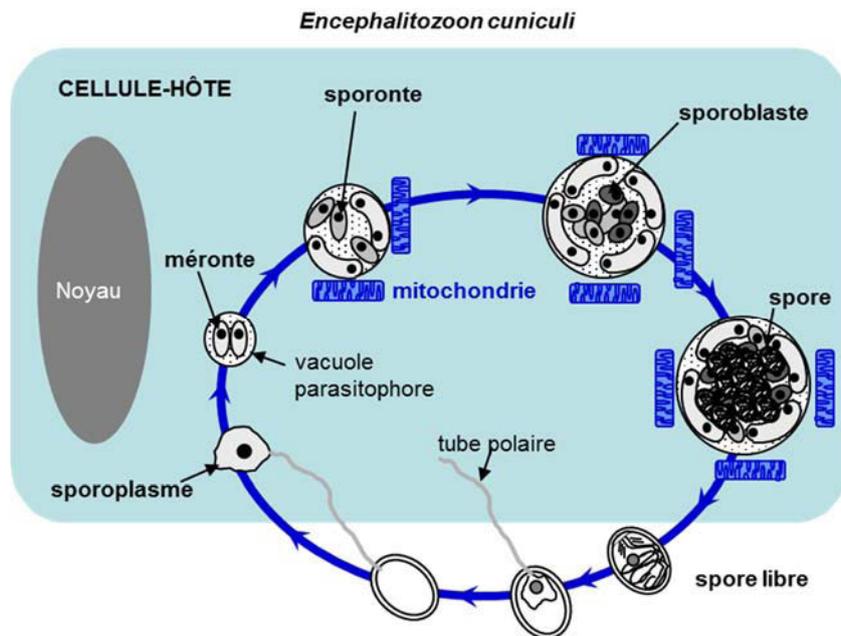


Figure 14. Cycles de développement d'*Encephalitozoon cuniculi*. L'ensemble du cycle d'*E. cuniculi* se déroule au sein d'une vacuole parasitophore (voir Figure 11). Le parasite se développe de façon centripète dans la vacuole c'est-à-dire que les mérozoites sont localisés à la périphérie, en contact étroit avec la membrane de la vacuole parasitophore, tandis que les spores matures sont localisées dans la région centrale (d'après Texier C., communication personnelle).

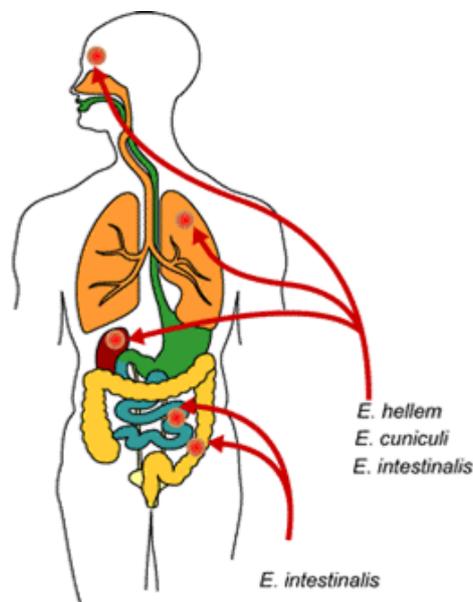


Figure 15. Développement d'*Encephalitozoon* chez l'Homme. *Encephalitozoon cuniculi* et *E. hellem* peuvent provoquer des infections des tracts respiratoire et uro-génital ainsi que des voies oculaires, et peuvent parfois se disséminer dans l'ensemble de l'organisme, jusqu'au cerveau. La 3^{ème} espèce du genre *Encephalitozoon*, *E. intestinalis* peut également toucher ces différents compartiments mais se retrouve principalement au niveau du tractus gastro-intestinal (Centers for Disease Control and Prevention).

années 1970. La présence d'*E. cuniculi* chez les patients atteints de poliomyélite, de néoplasies, ou encore du virus du SIDA, mis en avant le caractère opportuniste de ces espèces chez les patients immunodéprimés, et l'intérêt porté à l'étude de ce parasite fût grandissant.

3.1. L'encéphalitozoonose

L'infection à *Encephalitozoon*, appelée encéphalitozoonose, touche davantage les lagomorphes domestiques (animaux de compagnie et d'élevages cunicoles) que les lapins sauvages du fait qu'ils sont probablement moins nombreux. La prévalence d'*E. cuniculi* chez les lapins domestiques peut atteindre 37 à 86% de lapins infectés (Künzel & Joachim, 2010; Neumayerová *et al.*, 2014; Maestrini *et al.*, 2017). Elle touche également les lapins de laboratoire avec un fort pourcentage, allant jusqu'à 57% d'individus contaminés (Maestrini *et al.*, 2017). La détection de la maladie qui est réalisée en routine chez les lapins de laboratoire, se fait en testant la présence d'anticorps dans les sérums des animaux. Une élimination systématique des lapins est réalisée lorsque ceux-ci sont séropositifs, bien que la présence d'anticorps ne signifie pas que la maladie soit déclarée. Ainsi, l'encéphalitozoonose chez les lapins entraîne des pertes économiques pour ces filières. Pourtant, l'élimination des lapins n'est pas obligatoire en France, puisque la maladie n'est pas classée comme danger sanitaire de première ou seconde catégorie (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2017).

La contamination se fait principalement par voie orale et par contact direct avec un individu porteur ou *via* un environnement contaminé, mais certaines études suggèrent également l'existence d'une transmission transplacentaire chez les mammifères, notamment chez le lapin infecté par *E. cuniculi* (Baneux & Pognan, 2003). Une fois les spores ingérées, le parasite se propage dans l'organisme grâce au flux sanguin et se dissémine principalement dans les reins, le foie et les poumons, et parfois le cœur. À terme, les microsporidies peuvent envahir le cerveau et provoquer des dégâts irrémédiables (Künzel & Joachim, 2010). En effet, bien que l'infection soit généralement asymptomatique, elle peut parfois se révéler fatale, particulièrement pour les animaux dont le système immunitaire est affaibli. Une insuffisance pulmonaire, rénale ou urinaire, des troubles ophtalmiques avec une rupture du sac cristallinien ou le développement d'une uvéite phacoclastique (Benz *et al.*, 2011) sont les principaux signes cliniques observés. La maladie peut aussi se manifester par des troubles nerveux caractérisés par des désordres du système nerveux central tel que le syndrome vestibulaire (torticolis, perte d'équilibre, chute, mouvements oculaires incontrôlés, tremblements, paralysie des membres postérieurs). Le diagnostic d'une encéphalitozoonose due à *E. cuniculi* peut donc être établi suite à l'observation de ces symptômes, mais aussi plus précocement grâce aux tests sérologiques ainsi que la recherche des spores dans l'urine ou les fèces (Künzel & Joachim, 2010). La recherche d'anticorps, dans les sérums des de lapins artificiellement infectés par *E. cuniculi*, a révélé qu'ils étaient détectables 13 jours après infection, soit environ 15 jours avant que les spores ne soient détectables dans les

urines, et persistaient 2 à 3 mois en l'absence d'une nouvelle infection (Beaurin, 2006; Künzel & Joachim, 2010).

3.2. Traitement

L'élaboration de traitements efficaces contre les microsporidies reste relativement difficile en raison du mode de vie parasitaire intracellulaire, et de la constitution de la paroi sporale très résistante.

Actuellement, l'albendazole, antiparasitaire de la famille des benzimidazolés, est majoritairement utilisé pour traiter certaines microsporidies, notamment lors d'infections par les espèces du genre *Encephalitozoon* (*E. hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis*). Cette molécule ne peut être utilisée sur les lapins destinés à la consommation humaine en raison d'une absence d'autorisation de mise sur le marché (AMM), bien que l'albendazole ait été étudié chez des patients immunodéprimés atteints de microsporidiose (Weber *et al.*, 1994; Benz *et al.*, 2011). L'albendazole est cependant autorisé dans les médicaments vétérinaires destinés aux bovins, ovins et caprins selon l'ANSES². Son mode d'action consiste à bloquer la polymérisation de la β -tubuline formant les microtubules du cytosquelette. Cette molécule montre une forte affinité pour la β -tubuline des parasites, mais le traitement ne semble pas éradiquer entièrement l'infection (Weber *et al.*, 1994) et peut engendrer des effets secondaires néfastes sur le développement embryonnaire chez le lapin (Abu-Akkada & Oda, 2016). Des études *in vitro* portées sur l'utilisation de produits naturels, tel que le resvératrol, ont montré une efficacité quasi similaire à celle de l'albendazole (Leiro *et al.*, 2004).

La seconde molécule la plus utilisée est la fumagilline, un antibiotique identifié pour la première fois en 1949 produit par le champignon ascomycète *Aspergillus fumigatus*. La fumagilline inhibe l'activité de la méthionine aminopeptidase de type 2 (MetAP-2), une enzyme clé de la modification post-traductionnelle des protéines en éliminant les résidus de méthionine N-terminaux des protéines nouvellement traduites. Elle est donc essentielle au développement des cellules eucaryotes (Zhang *et al.*, 2005). Tandis que la plupart des eucaryotes possèdent les gènes codant deux types de méthionine aminopeptidases (MetAP-1 et MetAP-2), les microsporidies ne possèdent que le gène codant pour le type 2 (Katinka *et al.*, 2001; Corradi *et al.*, 2009), les rendant de ce fait plus sensibles à l'action de la fumagilline.

D'autres molécules, autorisées en médicament vétérinaires telles que l'oxytétracycline (antibiotique de la famille des tétracyclines, capables d'empêcher la fixation des ARN de transfert sur le ribosome), le fenbendazole (également de la famille des benzimidazolés), l'itraconazole (antifongique inhibiteur de la germination des spores) ou le lufénuron (inhibiteur de la chitine

² Index des Médicaments vétérinaires autorisés en France – index RCP (Résumés des Caractéristiques des produits) : <http://www.ircp.anmv.anses.fr/>. Consulté le 17 juillet 2017.

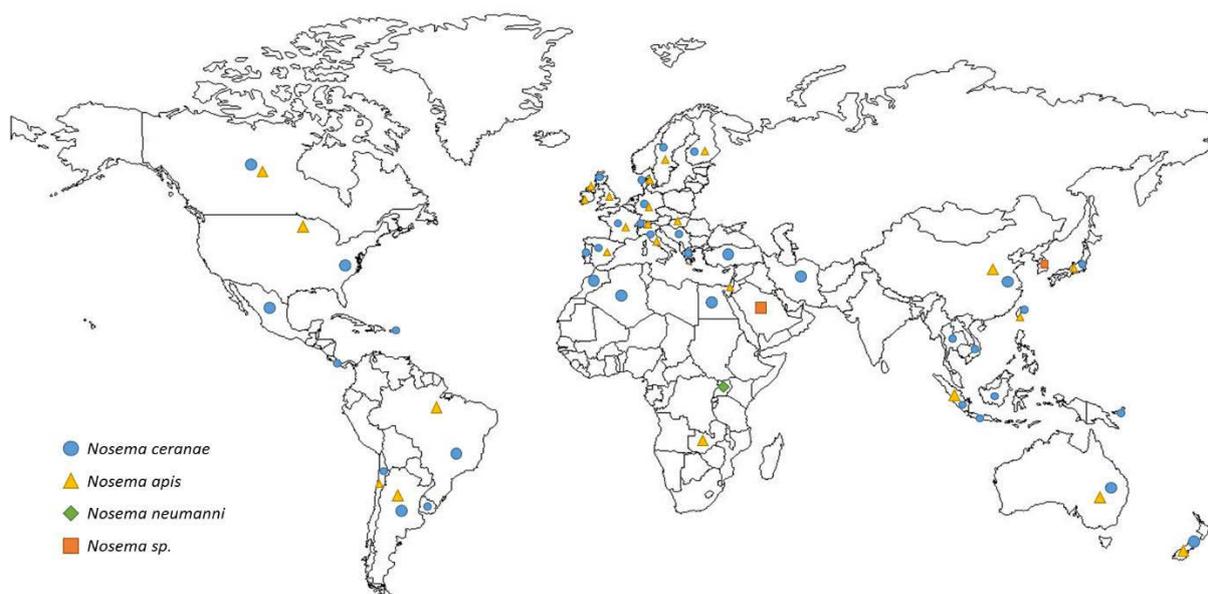


Figure 16. Distribution géographique des espèces *Nosema* dans les colonies d'*Apis mellifera*. Cartographie réalisée et mise à jour à partir des cartes de Dussaubat et d'Aufauvre (Dussaubat, 2012 ; Aufauvre, 2013 ; Goulson *et al.* 2015 ; Frazer *et al.*, 2016 ; Abdel-Baki *et al.*, 2016 ; Tsevegmid *et al.*, 2016 ; Maggi *et al.*, 2016 ; Chemurot *et al.*, 2017).

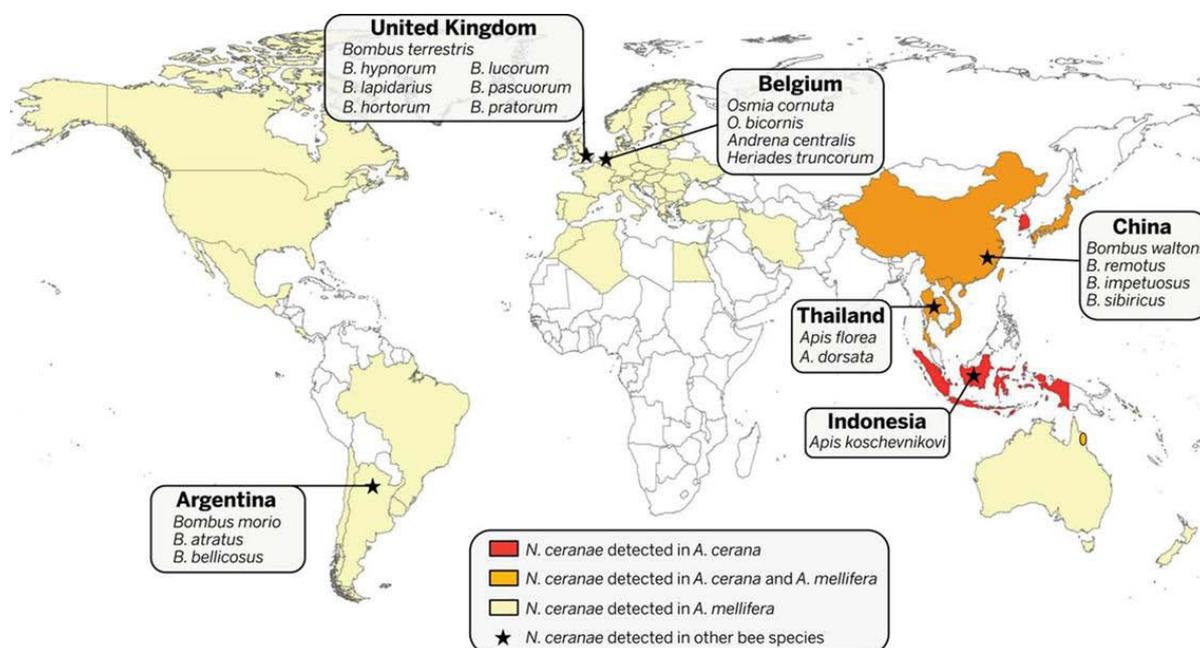


Figure 17. Distribution mondiale de la microsporidie *Nosema ceranae* dans différentes espèces d'Apoïdes. *N. ceranae* est initialement parasite de l'abeille domestique asiatique *Apis cerana* et a ensuite colonisé l'abeille domestique *Apis mellifera* dans de nombreuses régions du monde. Sa présence a également été détectée chez d'autres espèces d'Apidés (genres *Apis* et *Bombus*), de Megachilidés (*Osmia* et *Heriades*) et d'Andrénidés (*Andrena*). Erratum sur la figure originale : *Andrena ventralis* et non *Andrena centralis* (d'après Goulson *et al.*, 2015).

synthétase) ont été testées chez les animaux d'élevages ou domestiques pour traiter les microsporidioses, et notamment lutter contre le genre *Encephalitozoon*. Ces essais donnent cependant des résultats limités quant à l'élimination complète des parasites (Weber *et al.*, 1994; Taju *et al.*, 2011). Par exemple, il semblerait que l'administration en prophylaxie du fenbendazole chez des lapins infectés artificiellement par *E. cuniculi* soit plus efficace pour diminuer la charge parasitaire qu'un traitement curatif (Abu-Akkada & Oda, 2016).

4. *Nosema ceranae*, un nouveau parasite de l'abeille domestique

Plusieurs espèces microsporidiennes du genre *Nosema* affectant différents types d'hôtes ont été décrites, notamment les espèces telles que *Nosema bombycis*, agent responsable de la pébrine chez le vers à soie *Bombyx mori* (bombyx du mûrier de Chine, insecte Lépidoptère), *Nosema bombi* infectant les Hyménoptères de la famille des bourdons, ou encore *Nosema anthereae*, parasite d'*Antheraea pernyi* (ver à soie Tussah de Chine, insecte Lépidoptère) (Figure 3) (Chen *et al.*, 2009a). Présentes sur une grande partie du globe (Figure 16), deux espèces ont été mises en évidence chez l'abeille domestique *Apis mellifera* : *Nosema apis* et *Nosema ceranae*. Cependant, une troisième espèce, *Nosema neumanni*, présentant des caractéristiques structurales différentes des deux autres espèces, a très récemment été décrite chez *A. mellifera* en Ouganda (Chemurot *et al.*, 2017) (Figure 16). En effet, cette espèce est deux à trois fois plus petite que les deux autres espèces (environ 2,2 x 1,8 contre 4,4 x 2,2 pour *N. ceranae* et 6,0 x 3,0 pour *N. apis*) et présente un nombre de spires du tube polaire (entre 10 et 12 tours) moins important que *N. ceranae* et *N. apis* (respectivement 13 à 23 et environ 30 spires) (Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009a; Chemurot *et al.*, 2017).

15

Ces parasites intestinaux sont les agents étiologiques de la nosérose, une des maladies les plus répandues chez les abeilles adultes (Fries, 2010; Higes *et al.*, 2010), mais aussi chez d'autres espèces d'hyménoptères appartenant à la famille des bourdons (*Bombus*) ou des osmies (*Osmia*) (Figure 17) (Goulson *et al.*, 2015).

Dans le cadre d'un projet mené au laboratoire, une étude prospective a été menée en Mars 2017 en Auvergne (Figure 18). Elle visait à évaluer la présence de *N. ceranae* dans les colonies d'*A. mellifera* et d'évaluer la prévalence et la charge parasitaire des colonies infectées. Ainsi, sur 86 colonies analysées, 37,2% se sont révélées positives à *N. ceranae*.

Initialement, *N. ceranae* était un pathogène de l'abeille domestique asiatique *Apis cerana*, tandis que l'abeille européenne *Apis mellifera* était uniquement parasitée par *Nosema apis*. C'est en 2005 que *N. ceranae* a été observée pour la première fois chez *Apis mellifera*, même si sa présence, basée sur des observations microscopiques, était déjà soupçonnée depuis la fin des années 1970 (Higes *et al.*, 2007). L'équipe de Fries en Finlande a confirmé par des approches moléculaires, la présence de *N.*

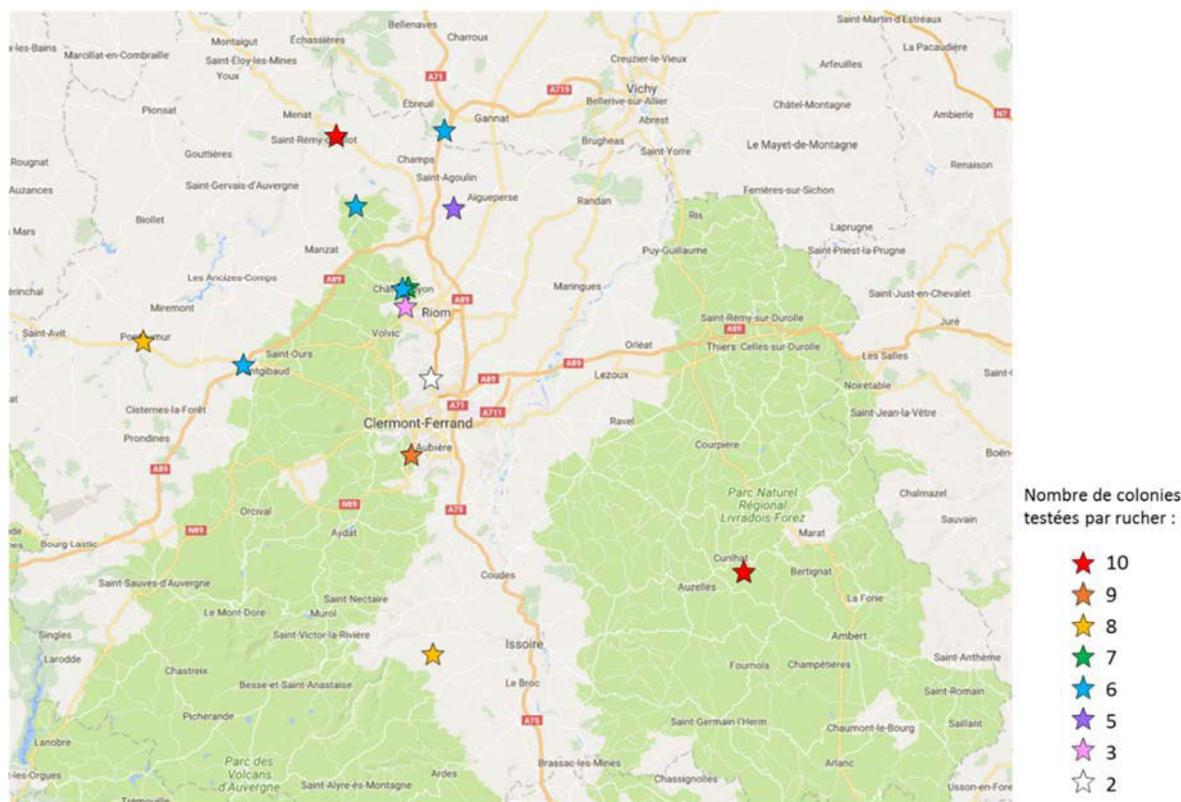


Figure 18. Localisation des 13 ruchers prospectés en Auvergne pour la détection de *N. ceranae*. 86 colonies d'*A. mellifera* ont été testées en Mars 2017, dans les départements du Puy-de-Dôme et de l'Allier. 32 colonies étaient positives à *N. ceranae*. Parmi elles, 22 colonies présentaient une prévalence d'abeilles infectées supérieure ou égale à 20% avec une charge sporale supérieure à 10^6 par abeille. Les 10 autres colonies ont été considérées en stade de transition entre l'état de colonie non infectée et l'état avéré d'infection. En effet, soit la prévalence était inférieure ou égale à 20% avec une charge parasitaire comprise entre 1 et 10^6 spores par abeille, soit la prévalence était inférieure ou égale à 10% avec une charge sporale supérieure ou égale à 10^6 par abeille. Sur les 86 colonies infectées, 25,6% ont été considérées comme étant en état d'infection avéré en sortie d'hiver (d'après Gerez T., communication personnelle).

ceranae dès 1998 dans les colonies d'*A. mellifera*, et l'absence de colonies infectées uniquement par *N. apis* depuis au moins 2006 (Paxton *et al.*, 2007). Aujourd'hui *N. ceranae* est devenue l'espèce microsporidienne prédominante infectant *A. mellifera* et est considérée comme une menace majeure pour les abeilles occidentales tant au niveau des individus que de la colonie (Fries, 2010; VanEngelsdorp & Meixner, 2010; Higes *et al.*, 2013a; Goulson *et al.*, 2015). La propagation de *N. ceranae* chez les abeilles occidentales laisse supposer une capacité de cette espèce à supplanter *N. apis*. Cependant, de récentes études où des abeilles ont été co-infectées par les deux espèces microsporidiennes n'a révélé aucun avantage concurrentiel pour *N. ceranae*. Ceci suggère que la concurrence directe, c'est-à-dire la quantité de spores produites dans les intestins de l'abeille, ne serait pas responsable du remplacement de *N. apis* par *N. ceranae* (Williams *et al.*, 2014; Milbrath *et al.*, 2015). Il est possible que d'autres facteurs externes, notamment environnementaux, affectant la transmission des pathogènes aient joué un rôle quant à l'issue de la compétition entre ces deux pathogènes pour un même hôte. L'hypothèse écologique de la reine rouge émise par Leigh Van Valen illustre le besoin continu des êtres vivants de rester adaptés à leur milieu. Ainsi, l'espèce *N. ceranae*, présente dans un environnement où ses hôtes occidentaux sont différents de ses hôtes asiatiques par leur comportement, leur physiologie ou leur génétique, a dû s'adapter rapidement pour survivre et proliférer, au détriment de *N. apis*.

4.1. L'abeille domestique *Apis mellifera*

L'abeille domestique appartient à la catégorie des insectes dits « eusociaux ». Le degré de socialité chez les insectes se distingue en fonction du mode de groupement des individus et du type d'interactions qu'ils adoptent les uns par rapport aux autres.

Au plus bas niveau du comportement social, les groupes sont qualifiés de « grégaires » : les individus vivent groupés et communiquent entre eux *via* des échanges chimiques, tels que les phéromones, mais aussi visuels et tactiles. La plupart des blattes par exemple, adoptent ce mode de socialité. Les insectes dits « subsociaux » manifestent, en plus du comportement grégaire, des comportements de type parental comme la manipulation des œufs, la défense de la progéniture et parfois même sa nutrition. Deux comportements sont distincts chez ces femelles subsociales : le comportement « colonial » où les femelles se répartissent les tâches pour élever les larves dans des sites collectifs comme un nid ou une galerie, et le comportement « communal » où les femelles coopèrent sans spécialisation des tâches, ce dernier restant relativement rare chez les insectes.

Enfin, les insectes caractérisés d'« eusociaux », notamment les abeilles domestiques, d'autres hyménoptères tels que les fourmis, certains bourdons, guêpes ou frelons, mais aussi les isoptères comme les termites, réunissent les caractéristiques de la subsocialité. Ce niveau social est cependant plus accentué puisque les individus vont coopérer dans le soin porté à la progéniture et son nourrissage

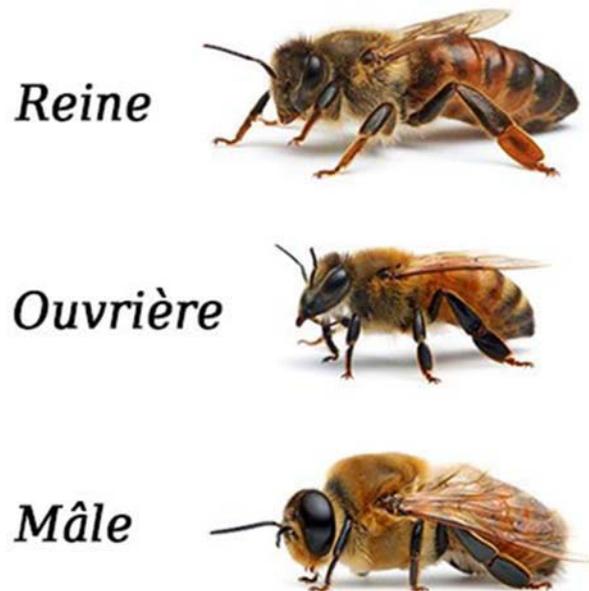


Figure 19. Les différentes castes présentes au sein d'une colonie d'abeilles domestiques. Une colonie d'abeilles est formée de trois castes à la morphologie différente et aux rôles distincts. Elle se compose (i) d'une reine (en haut), dont l'unique tâche est de pondre pour assurer la pérennité de la colonie, (ii) de plusieurs dizaines de milliers d'ouvrières (au centre) qui assurent toutes les autres fonctions nécessaires à la survie de la colonie, (iii) et de quelques milliers de mâles (en bas) dont l'unique tâche est de féconder les reines. La colonie comprend également le couvain qui correspond aux différents stades de développement au sein des alvéoles, incluant les œufs, les larves et les nymphes (Image : site de l'Institut Français de l'Éducation).

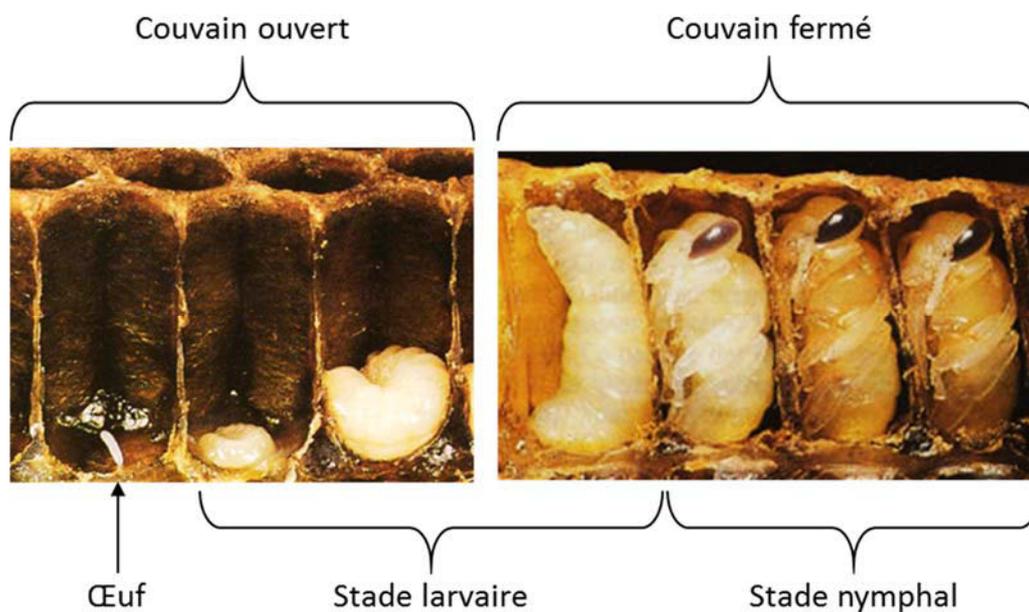


Figure 20. Les trois stades de développement des abeilles pré-émergence. Le couvain est pondu dans les alvéoles des cadres situés au centre de la ruche et maintenu à une température d'environ 35°C pour un développement optimal des larves tandis que la température interne de la ruche maintenue par les ouvrières oscille autour de 33°C. L'œuf éclot 3 jours après la ponte. Une reine adulte émergera 16 jours après la ponte de l'œuf contre 21 jours pour une abeille ouvrière et 24 jours pour un mâle. La différenciation reine/ouvrière s'effectue *via* la composition de l'alimentation de la larve puisqu'une future reine sera nourrie à la gelée royale tandis que les futures ouvrières, à l'instar des mâles, seront nourries avec une gelée nourricière, mélange de gelée royale, de miel et de pollen.

qui est, dans ce cas, systématique. À ces caractéristiques parentales s'ajoutent les critères suivants : le chevauchement des générations dans une même cohorte d'individus, ainsi que la cohésion entre les membres du groupe et la division du travail selon leur âge et leur caste. Ce comportement est nommé polyéthismes d'âge et de caste.

Concernant les abeilles domestiques, la colonie est composée de trois castes (Figure 19) : une reine, unique femelle féconde de la ruche, des ouvrières diploïdes (issues d'œufs fécondés) et des faux-bourçons, mâles reproducteurs haploïdes (issus d'ovules non fécondés, c'est la parthénogénèse arrhénotoque³). Le couvain, comprenant trois stades de développement, les œufs, les larves et les nymphes (Figure 20), représente une grande part de la population de la colonie et est surveillé de près par les ouvrières, tant dans la quantité en fonction des besoins de la colonie que dans le développement de la larve jusqu'à l'émergence des imagos.

Au fait que maintenir une colonie d'abeilles en laboratoire est impossible, s'ajoute le fait qu'une seule abeille fécondée, la reine, est responsable de la reproduction de la colonie entière, rendant ce modèle difficile à étudier en termes de physiologie moléculaire. En effet, en conditions naturelles, une reine se fait féconder par plusieurs mâles une seule fois dans sa vie et conserve ensuite les spermatozoïdes dans une spermathèque. Ceci lui permet d'effectuer le brassage génétique de sa colonie, et de contrôler la fécondation de ses ovules selon les besoins en ouvrières ou en mâles. Il paraît ainsi compliqué de conserver une lignée mutante stable sur plusieurs générations, dans le but d'étudier une fonction ou voie métabolique, et de caractériser les différents protagonistes. Il est cependant possible d'inséminer artificiellement une reine, afin de mieux contrôler la génétique de la descendance. Ceci peut notamment permettre de sélectionner, sur plusieurs générations, des caractères particuliers d'une colonie, comme par exemple le comportement hygiénique (Nicodemo *et al.*, 2013).

17

4.2. Caractéristiques générales de la nosérose de l'abeille

La nosérose de l'abeille est considérée en France comme un danger sanitaire de première catégorie, uniquement lorsqu'elle est déclarée par l'espèce *Nosema apis*, agent de la nosérose de type A. L'espèce *Nosema ceranae*, responsable de la nosérose de type C, quant à elle, est classée en danger de catégorie 3, ne nécessitant pas de précautions particulières (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2017) (Annexe 3).

³ La parthénogénèse arrhénotoque s'oppose à la parthénogénèse thélytoque où les œufs non fécondés ne produisent que des femelles (ex : pucerons au printemps, phasmes). Quant à la parthénogénèse deutérotoque, la descendance est constituée de mâles et de femelles (ex. : pucerons en automne, papillon *Lymantria*).

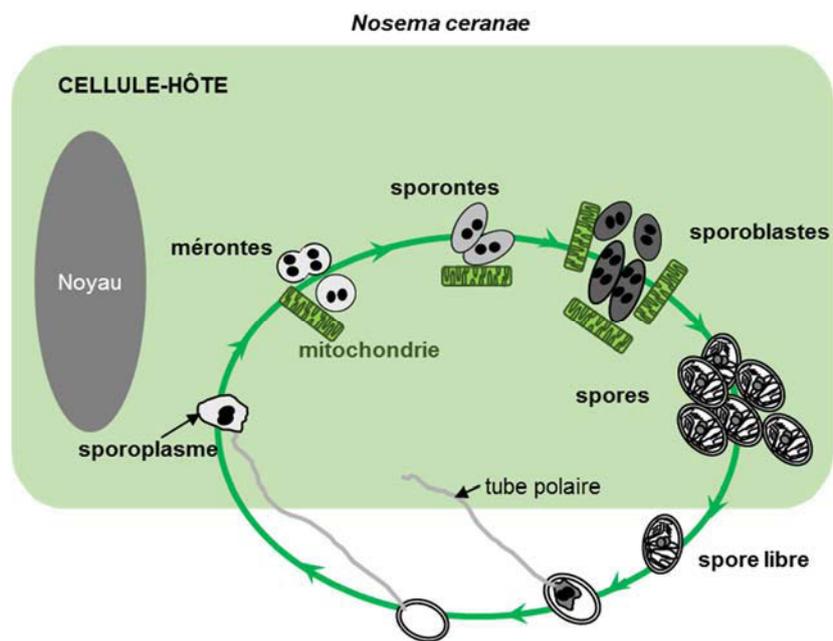


Figure 21. Cycle de développement de *Nosema ceranae*. Le cycle de *N. ceranae*, contrairement à *E. cuniculi*, a lieu en contact direct avec le cytoplasme de la cellule-hôte après le transfert du sporoplasme, jusqu'à la formation de nouvelles spores matures (d'après Texier C., communication personnelle).

Chez les hyménoptères infectés par *Nosema* sp., les spores ingérées migrent dans le tractus digestif jusqu'à l'intestin où elles envahissent les cellules de l'épithélium intestinal (White, 1919), où elles se multiplient (Figure 21). À terme, la propagation de *Nosema* entraîne des lésions irréversibles du tissu intestinal. Il semblerait, selon la littérature, que les cellules basales, cellules souches de l'intestin, soient également susceptibles d'être infectées (Higes *et al.*, 2007). Cependant, des travaux menés au sein de notre laboratoire chez les abeilles infectées par *N. ceranae*, suggèrent au contraire que les cellules souches seraient exemptes des microsporidies (Figure 13). Ces données, obtenues par des marquages de l'ADN des parasites au DAPI, ont été confirmées par des approches d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Données non publiées).

N. ceranae est capable d'infecter les ouvrières adultes, mais aussi la reine (Higes *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2015) et les faux-bourçons (Traver & Fell, 2011). La contamination se fait principalement par voie féco-orale par ingestion de spores (Smith, 2012), ou par trophallaxie⁴ dont la fréquence semble d'ailleurs augmenter lorsque les abeilles sont infectées par *N. ceranae* (Lecocq *et al.*, 2016). L'étude de Chen et Evans, suggérant la présence de *N. ceranae* dans les glandes hypopharyngiennes et salivaires (Annexe 2), laisse supposer l'existence d'une contamination possible des jeunes abeilles ou de la reine, nourries avec de la gelée royale produite par les abeilles contaminées. Des analyses moléculaires ont également révélé la présence de *Nosema* sp. dans d'autres organes comme les tubes de Malpighi ou le corps gras. Cependant, la présence des parasites n'a pas été confirmée visuellement (Chen *et al.*, 2009a). D'autres études ont permis de détecter *N. ceranae* ou *N. apis* par PCR dans d'autres glandes (mandibulaires, salivaires, et à venin) (Copley & Jabaji, 2012), ou dans les organes reproducteurs des abeilles, à savoir les ovaires et la spermathèque des reines (Traver & Fell, 2012). La contamination du sperme des mâles a également été mise en évidence, suggérant la possibilité d'une contamination verticale (Peng *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2015), bien que celle-ci n'a pu être établie puisque la détection de parasites dans les œufs n'a encore jamais été obtenue. De plus, récemment un étude a montré que la mise en contact des spores de *N. apis* avec du liquide séminal de faux-bourçons diminuait la viabilité des spores de 80%, réduisant les risques de contamination sexuelle, bien que la faible fraction de spores survivantes conserve leur capacité d'infection (Baer *et al.*, 2016).

L'infection par *Nosema* est souvent asymptomatique. Dans les formes aiguës, la plupart du temps associées à l'infection par *N. apis*, des troubles digestifs surviennent : polyphagie, abdomen gonflé, diarrhées de couleur jaune brunâtre, ou encore des difficultés à voler (Fries *et al.*, 2006). Des lésions

⁴ La trophallaxie consiste, chez les insectes eusociaux, à régurgiter de la nourriture prédigérée contenue dans le jabot pour la transmettre aux autres membres de la colonie. En plus du rôle nutritif, la trophallaxie permet de maintenir la communication entre les ouvrières, notamment sur l'emplacement de la source de nourriture.

de l'intestin moyen apparaissent également, et peuvent lui donner une structure molle et un aspect blanc laiteux (Higes *et al.*, 2007). De nombreuses abeilles atteintes de nosérose finissent par mourir généralement à l'extérieur de la ruche. Le plus souvent, ce sont les infections par *N. apis* qui sont liées à une dysenterie dont les symptômes, notamment des fèces de type diarrhéique, peuvent être visibles sur et dans la ruche, et deviennent alors une source de contamination directe pour les autres individus de la colonie. De tels symptômes ne sont en général pas observés lors d'une infection par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008, 2010; Fries, 2010) et la maladie est de ce fait qualifiée de « nosérose sèche ».

Ainsi, l'existence de colonies d'abeilles infectées par *N. ceranae* mais ne présentant aucun des symptômes associés à la maladie, bien qu'une dépopulation puisse être observée, pose la question du caractère opportuniste de ce pathogène chez l'abeille. Pourtant, certaines études suggèrent que *N. ceranae* serait plus pathogène que *N. apis* du fait de d'une intensité d'infection et/ou de mortalité des abeilles plus élevées en présence de *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2014), mais aussi de sa capacité à inhiber la réponse immunitaire de l'hôte, en réprimant notamment l'expression de certains gènes codant pour des peptides antimicrobiens (PAM) (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Badaoui *et al.*, 2017). La virulence de *N. ceranae* pourrait également dépendre de son origine géographique, suggérant la présence d'isolats génétiquement différents (Chaimanee *et al.*, 2013; Higes *et al.*, 2013b). Cependant, certaines études montrent que lorsqu'une même souche d'abeilles est infectée par deux isolats géographiquement distincts, aucune différence significative n'est observée concernant la survie des abeilles, les lésions tissulaires intestinales ou la charge parasitaire (Roudel *et al.*, 2013; Van der Zee *et al.*, 2014). Une autre étude montre au contraire une réponse immunitaire variable en fonction de l'origine géographique de la souche de *N. ceranae* (Branchiccela *et al.*, 2017). Ainsi les différences de virulence observées pourraient être le résultat d'interactions avec d'autres facteurs tels que le climat, les pratiques apicoles, le fond génétique de l'abeille (Fontbonne *et al.*, 2013; Kurze *et al.*, 2016b), ou encore être la réponse à des perturbations environnementales, comme la présence d'autres pathogènes ou de xénobiotiques⁵ (Bromenshenk *et al.*, 2010).

Confrontée à l'émergence de pathogènes durant les dernières décennies, *A. mellifera* a dû évoluer en développant des caractères de résistance et/ou de tolérance face à la pression parasitaire, et notamment face à *Nosema* sp. (Kurze *et al.*, 2015, 2016a, 2016b). Certaines lignées d'abeilles sélectionnées pour leur tolérance à *Nosema* présentent ainsi une plus faible mortalité et une réponse immunitaire plus constante que les abeilles qui y sont sensibles (Huang *et al.*, 2012).

De manière générale, dans une relation hôte-pathogène, le caractère résistant de l'hôte se définit comme sa capacité à limiter les dommages induits par une charge parasitaire donnée, y compris sur

⁵ Ces deux derniers points seront développés pages 30 à 33.

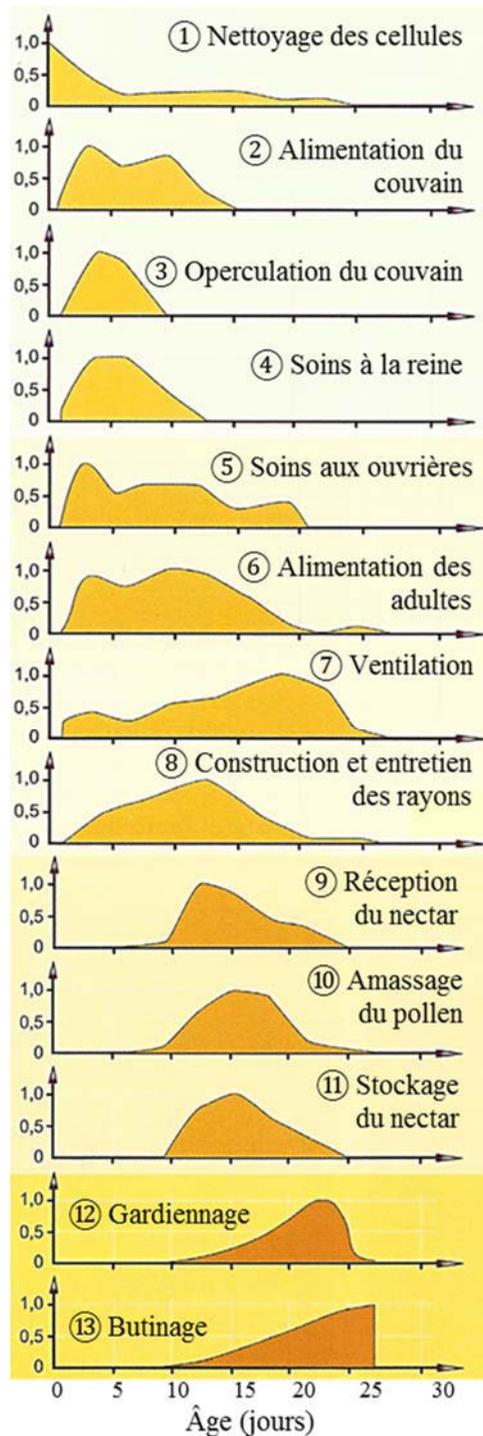


Figure 22. L'ouvrière : une travailleuse hors norme. Ce graphique représente le polyéthisme d'âge chez une abeille ouvrière d'été. Après désoperculation de l'alvéole et sortie de l'abeille, cette dernière est dite émergente et est considérée comme adulte. Elle effectue alors jusqu'à la fin de sa vie différentes tâches nécessaires au bon fonctionnement de la colonie, dont la plupart s'effectuent à l'intérieur. La fréquence des tâches est représentée en ordonnée sur une échelle de 0 à 1 (d'après Clément *et al.*, 2013).

leur fitness (leur capacité à survivre et à se reproduire), tandis que les hôtes tolérants voient leur fitness diminuer avec l'augmentation de la charge parasitaire. À l'inverse, les agents pathogènes ont un effet néfaste sur la fitness des individus sensibles (Råberg *et al.*, 2009). L'étude de ces caractères chez les abeilles nécessite la prise en compte de plusieurs facteurs, tels que la structure sociale de la population et l'haploïdie des mâles (Kidner & Moritz, 2013). Il est également important de différencier la résistance et la tolérance au niveau de la colonie et au niveau individuel, le caractère de résistance des individus ne définissant pas obligatoirement celui de la colonie.

En effet, une colonie composée d'individus résistants à un agent pathogène est de ce fait susceptible d'être également résistante à l'échelle de la colonie. Cependant, si la colonie est composée d'individus tolérants dont la fitness diminue avec l'augmentation des parasites, celle-ci pourrait tout de même devenir résistante (par exemple à *Nosema*) en compensant cette diminution de fitness individuelle par une augmentation du nombre d'individus au sein de la colonie. En outre, la structure et le mode de reproduction de la colonie, si elle est tolérante plutôt que résistante, lui permettent d'endurer une infection sans subir d'effets négatifs adaptatifs, comme par exemple suite à une invasion par *Varroa* (Kurze *et al.*, 2016b).

Les moyens de défenses qu'utilisent les abeilles pour lutter contre ce parasite, à l'échelle de la colonie et au niveau individuel, seront abordés dans les prochains paragraphes.

20

4.3. La nosérose et la colonie

4.3.1. Effets sur la colonie

En fonction de son âge, l'abeille ouvrière effectue différentes tâches à l'intérieur puis à l'extérieur de la ruche (Figure 22). *N. ceranae* entraînant une activité de butinage plus précoce chez les abeilles infectées (Goblirsch *et al.*, 2013a), l'équilibre de la répartition des tâches à l'intérieur de la ruche s'en voit perturbé. Aussi, le désordre créé, notamment avec l'augmentation du nombre de butineuses et la diminution d'abeilles allouées aux tâches internes à la ruche, peut être responsable de l'affaiblissement de la colonie, voire de son effondrement.

En outre, l'infection aurait un impact d'autant plus important sur la colonie lorsque les reines sont infectées, puisque *N. ceranae* est capable de circuler par transmission horizontale des ouvrières à la reine (Higes *et al.*, 2009). La ponte des reines non infectées étant naturellement en baisse à mesure que le contenu de la spermathèque s'épuise, les reines plus âgées infectées par *N. ceranae* pourraient avoir de plus grandes difficultés à compenser les effets délétères du parasite sur la colonie (Simeunovic *et al.*, 2014). Parce qu'elle est l'unique femelle féconde de la colonie et productrice de phéromones nécessaires au maintien de la cohésion de la colonie, une reine infectée et affaiblie par la maladie pourrait ainsi compromettre le renouvellement des ouvrières et donc, la stabilité de sa colonie (Alaux

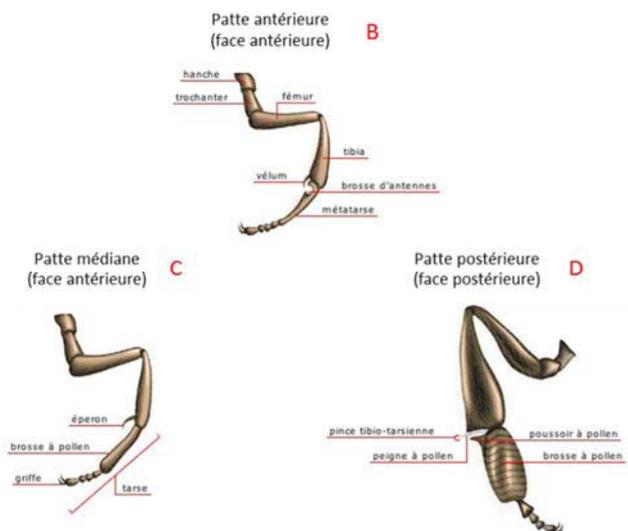


Figure 23. L'auto-toilettage des abeilles. Les abeilles se toilettent (A) à l'aide de leurs trois paires de pattes. Les pattes antérieures (B) sont dotées de peignes (poils rigides) pour le nettoyage de la tête et les abeilles utilisent la brosse à antennes et le vélum pour celui des antennes. La paire de pattes médiane (C) est utilisée pour toiletter la tête, une partie du thorax (A), les flancs et le ventre. Elle est également dotée d'un épéron servant à détacher les pelotes de pollen maintenues dans les pattes postérieures. Cette dernière paire de pattes (D) comporte un peigne et une corbeille à pollen sur chaque patte. Elle possède également une pince servant à extraire les lamelles de cire qui se forment sous l'abdomen depuis les glandes cirières. À chaque extrémité des pattes se trouvent deux griffes entre lesquelles se loge un coussinet, permettant aux abeilles de se déplacer sur tous les types de supports, rugueux ou lisses. L'accès au-dessus de l'abdomen est plus difficile, ce sont souvent les congénères qui participent au toilettage, durant l'allo-toilettage (d'après Adam, 2010, images : ikonet.com).

et al., 2011; Roberts *et al.*, 2015). Ainsi, l'infection par *N. ceranae* perturberait l'homéostasie de la colonie à différents niveaux, et aurait pour conséquence une diminution la population de colonie, la quantité de couvain et la production de miel (Botías *et al.*, 2013; Simeunovic *et al.*, 2014)

À l'heure actuelle les opinions scientifiques divergent, considérant tantôt *N. ceranae* comme l'un des responsables directs des pertes de colonies en sortie de l'hiver (Higes *et al.*, 2008), tantôt comme un parasite dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs aggravants comme par exemple, l'exposition aux pesticides, (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012) ou la co-infection avec d'autres agents pathogènes.

4.3.2. L'immunité sociale

Le séquençage du génome d'*Apis mellifera* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006) a révélé que l'abeille ne possédait qu'un tiers des gènes impliqués dans l'immunité, comparativement à d'autres insectes tels que la mouche *Drosophila melanogaster* et le moustique *Anopheles gambiae* (Claudianos *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2006; Rand *et al.*, 2015). Ce déficit en gènes impliqués dans les systèmes immunitaires et les processus de détoxication pourrait être compensé par l'organisation sociale des colonies (Nikolenko *et al.*, 2012) et le comportement hygiénique des abeilles, ou au contraire en être la conséquence.

Les abeilles eusociales limitent en effet la prolifération de certains agents pathogènes au sein même de la colonie, par ces comportements qui forment l'immunité dite « sociale » (Cremer *et al.*, 2007; Evans & Spivak, 2010). Pour cela, les abeilles effectuent des tâches de toilette sur elles-mêmes (auto-toilette) grâce aux différentes structures présentes sur chaque paire de pattes (Figure 23), et sur leurs congénères (allo-toilette) par léchage, ainsi que des activités de nettoyage des alvéoles et de l'intérieur de la ruche. L'auto-toilette permet aux abeilles d'éliminer les particules étrangères telles que des poussières, et de récupérer le pollen récolté. Il permet aussi de se défendre contre le parasite *Acarapis woodi*, un acarien parasite présent sur le corps des abeilles et proliférant dans leurs trachées. L'allo-toilette quant à lui, permet aux abeilles de retirer particules étrangères et parasites présents sur les parties du corps de leurs congénères, inaccessibles pour elles. Chez les abeilles asiatiques *A. cerana*, ce comportement peut s'avérer être une première étape essentielle pour se débarrasser de l'acarien parasite *Varroa destructor* au cours de sa phase phorétique⁶ (Evans & Spivak, 2010). Il est à noter toutefois que le toilette peut être à double tranchant puisque dans certains cas, lors des

⁶ Les *Varroa* phorétiques correspondent aux *Varroa* en phase d'accroche à l'hôte, souvent dissimulés sous les sternites (cuticules abdominales), entre le 2^{ème} et le 5^{ème} sternite. Cette phase, non indispensable, dure entre 1 et 10 jours avant que le parasite n'effectue sa phase de reproduction en pénétrant à l'intérieur d'une alvéole ouverte de couvain.

infections virales, bactériennes ou microsporidiennes, il aura un effet inverse et favorisera la propagation des pathogènes par contact au sein de la colonie.

Les abeilles peuvent également développer un comportement hygiénique plus ou moins marqué selon les espèces et les souches. Ce comportement est par définition, un comportement d'hygiène spécifique où les abeilles adultes adoptent une réponse collective à la présence d'agents pathogènes au sein du couvain, en condamnant les alvéoles malades ou en retirant les larves et les nymphes atteintes. Cette propension au comportement hygiénique semble être fortement liée à la sensibilité olfactive des abeilles, capables de détecter les variations d'odeurs du couvain et de localiser les cellules malades, comme par exemple lors d'une infection par le champignon *Ascosphaera apis* (Annexe 3) (Swanson *et al.*, 2009), ou encore lorsque le couvain est atteint de varroose chez *A. cerana*. Cependant, comme pour le toilettage, l'élimination du couvain malade peut également faciliter la transmission des pathogènes lors de sa manipulation, en particulier si les abeilles ne sont pas particulièrement soigneuses (Evans & Spivak, 2010). Ajouté à ce comportement, il semblerait que les abeilles en bonne santé d'une colonie adoptent une différence de comportement face aux abeilles infectées par *N. ceranae*. En effet, un comportement agressif des abeilles non infectées a été constaté vis-à-vis des abeilles infectées, conduisant parfois à l'élimination des individus malades (Kurze *et al.*, 2016b). De plus, il semblerait que les abeilles infectées évitent les abeilles plus infectées qu'elles. Un tel comportement a également été observé chez les abeilles contaminées par le virus des ailes déformées (DWV) (Kurze *et al.*, 2016b). Ainsi, ces deux comportements, d'évitement et d'élimination, peuvent permettre de limiter la transmission de *N. ceranae* dans la colonie.

Enfin, les abeilles dites « gardiennes » ont pour rôle d'interdire l'accès de la ruche aux abeilles présentant des symptômes de maladies ou d'intoxication. En outre, les abeilles sont également capables d'adopter un comportement nécrophorique, c'est-à-dire qu'elles éprouvent le besoin d'évacuer les abeilles mortes hors de la ruche, comportement que l'on retrouve encore plus prononcé chez certaines espèces de fourmis. Cependant, chez les abeilles, la majorité des individus meurent à l'extérieur de la colonie, soit de manière fortuite, soit de manière altruiste (Evans & Spivak, 2010). La présence de cadavres à l'intérieur de la ruche étant limitée, la transmission des maladies au sein de la colonie s'en voit ainsi diminuée.

Les abeilles ont aussi la particularité de disposer de moyens d'automédication au cœur même de la ruche. En effet, le miel, le pain d'abeille (pollen stocké dans les alvéoles) et la propolis contiennent des composés antibactériens, antifongiques et antiviraux, qui sont d'ailleurs souvent utilisés pour apaiser nos propres maux. Le pollen récolté contient des flavonoïdes et caroténoïdes aux propriétés antioxydantes. Quant à la propolis, que les abeilles ouvrières fabriquent à partir de résine végétale, de cire et de salive, elle permet entre autre de désinfecter la ruche grâce au parabène (présentant des propriétés antibactériennes et antifongiques) qu'elle contient. Elle permet également d'embaumer les

intrus tués trop imposants pour être évacués de la ruche, et éviter ainsi leur putréfaction. Enfin, l'élevage des larves à la gelée royale, riche en minéraux et présentant des propriétés antiseptiques, et la thermorégulation de la ruche, permettent également de limiter certaines affections au sein de la colonie (Clément *et al.*, 2013).

4.4. La nosémosse et l'abeille : l'abeille et la bête

4.4.1. Effets de *N. ceranae* sur la mortalité des individus

La présence de *N. ceranae* chez les abeilles réduit globalement leur durée de vie (Higes *et al.*, 2006; Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Goblirsch *et al.*, 2013a). Cependant, certaines disparités entre les études dans les taux de mortalité induits par l'infection sont à noter.

En effet, les taux de mortalité peuvent être très élevés, atteignant 93% 7 jours après une inoculation expérimentale de 100 000 à 125 000 spores de *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2011). Dans certains cas, la totalité des abeilles infectées sont mortes entre deux et trois semaines après l'infection (Higes *et al.*, 2008; Dussaubat *et al.*, 2012, 2013b). En revanche, d'autres études utilisant les mêmes doses infectieuses ont montré des taux de mortalité beaucoup plus faibles, variant de 30% (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2014) à 45% (Paxton *et al.*, 2007; Vidau *et al.*, 2011a; Roussel *et al.*, 2015). D'autres études suggèrent également que *N. ceranae* engendrerait une mortalité plus rapide et/ou plus importante que *N. apis* chez *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2014), mais ces résultats ne semblent pas non plus extrapolables à tous les cas d'études (Forsgren & Fries, 2010).

Cette variabilité du taux de survie des abeilles face à l'infection peut dépendre de la dose infectieuse, c'est-à-dire qu'elle diminue lorsque la dose infectieuse augmente (Martín-Hernández *et al.*, 2011), mais cet effet dose-dépendant n'est pas toujours constaté (Porrini *et al.*, 2011). De plus, il est difficile de comparer directement les résultats de mortalité obtenus dans les différentes études compte tenu de la diversité des protocoles expérimentaux utilisés. En effet, certaines études sont réalisées sur des abeilles contenues en mésocosme (cagettes en laboratoire, colonies placées sous tunnel), ou sur des colonies maintenues dans leur environnement naturel (*i.e.* plein champs). De plus, toutes les études n'utilisent pas les mêmes souches d'abeilles ou de parasites, et les abeilles peuvent être infectées à des âges différents et suivre un régime alimentaire adapté à la question scientifique sous-jacente (ajout de pollen, utilisation de sucre industriel, de miel...). Tous ces facteurs peuvent ainsi fortement moduler l'impact des parasites sur la survie de leur hôte. Aussi, le consortium international (*Prevention of honeybee COLony LOSSes*) formé de chercheurs, de vétérinaires, de professionnels de la filière et d'étudiants, coopère notamment dans le but de centraliser les travaux de recherche portés sur l'abeille. Un recueil de méthodes standardisées (COLOSS BEEBOOK) a récemment été publié,

portant par exemple sur le maintien des abeilles en cagettes (Williams *et al.*, 2013), la recherche toxicologique (Medrzycki *et al.*, 2013), les différents parasites tels que *Nosema* (Fries *et al.*, 2013), ou encore l'étude du microbiote (Engel *et al.*, 2013). À terme, ce recueil devrait devenir une référence et permettre de standardiser les méthodes de travail afin de comparer plus facilement les résultats des différentes études.

N. ceranae peut également avoir un impact négatif sur la survie des reines. Dussaubat et collaborateurs ont ainsi observé une mortalité atteignant 55% chez des reines, 100 jours après une infection expérimentale avec 200 000 spores de *N. ceranae* par reine (Dussaubat *et al.*, 2016). Il semblerait toutefois que les reines soient moins susceptibles de développer l'infection à mesure qu'elles vieillissent, même suite à une infection expérimentale, et il y aurait, comme dans certains cas chez les ouvrières, un effet dépendant de la dose infectieuse (Chaimanee *et al.*, 2014).

4.4.2. Effets de *N. ceranae* sur les activités de butinage

Il a été montré que la présence de *N. ceranae* pouvait perturber les activités de butinage notamment en diminuant les capacités d'orientation des abeilles, perturbant le retour des abeilles à leur ruche (Colin *et al.*, 2004; Mayack & Naug, 2010; Decourtye *et al.*, 2011). En effet, une étude a montré que les abeilles infectées par *Nosema* sp. éprouaient des difficultés à retourner dans leur colonie, et les butineuses qui y parvenaient mettaient en moyenne 1,8 fois plus de temps que les abeilles non infectées. En outre, ces mêmes abeilles infectées semblaient rester à l'entrée de la ruche sans vraiment rentrer dans le cœur de la colonie, reflétant probablement une certaine désorientation (Kralj & Fuchs, 2010). Dans ce cas de figure où les butineuses se verraient désorientées, épuisées, incapables de rentrer à la ruche, il est aussi envisageable qu'une stratégie adaptative de l'hôte soit développée afin de limiter la propagation du parasite dans la colonie.

Cependant, une étude plus récente a montré que les butineuses infectées par le parasite présentaient un nombre plus élevé de sorties par jour que les abeilles non-infectées (Dussaubat *et al.*, 2013b). *N. ceranae* pourrait donc augmenter l'état d'épuisement des butineuses par cette hausse d'activité de vol. L'augmentation de celle-ci pourrait être un effet compensatoire de la diminution du nombre de butineuses perdues lors des activités de butinage.

En outre, sous nos latitudes, les ouvrières d'été ont une durée de vie d'environ 6 semaines après leur émergence, et c'est aux alentours de 3 semaines que s'effectue la transition abeille d'intérieur à abeille d'extérieur (Clément *et al.*, 2013) (Figure 22). Ce comportement de maturation des butineuses est régulé, en fonction des besoins de la colonie, par différentes substances telles que l'oléate d'éthyle (OE), une phéromone permettant de retarder l'âge du butinage, l'hormone juvénile (HJ) et la glycolipoprotéine vitellogénine (Vg), participant toutes deux à la maturation des abeilles. En effet, chez

les jeunes abeilles, le taux de Vg est élevé tandis que celui de l'HJ est faible. Ces taux s'inversent lorsque l'abeille devient butineuse, l'HJ venant inhiber la synthèse de Vg responsable du blocage de la maturation des abeilles (Antúnez *et al.*, 2009; Goblirsch *et al.*, 2013a). De même, l'accumulation de Vg dans l'hémolymphe est en corrélation positive avec la durée de vie des abeilles d'hiver qui vivent plus longtemps que les abeilles d'été en freinant leur maturation (Havukainen *et al.*, 2013). Or, lorsque les jeunes abeilles sont infectées par *N. ceranae*, les taux d'HJ et de Vg sont similaires à ceux des butineuses, entraînant un comportement de butinage plus précoce et une durée de vie raccourcie d'environ 9 jours en comparaison avec des abeilles non-infectées (Goblirsch *et al.*, 2013a). En effet, le niveau d'expression du gène codant pour la vitellogénine semble diminué chez les abeilles infectées par *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2009). Cette diminution semble corrélée avec l'augmentation de la charge sporale chez les abeilles infectées (Antúnez *et al.*, 2013). Cependant, ce résultat semble différer selon les protocoles utilisés puisque certaines études n'ont pas constaté de variation de l'expression du gène *vg* (Chaimanee *et al.*, 2012; Branchiccela *et al.*, 2017). Étonnamment, l'expression du gène *vg* est cependant augmenté lorsque les abeilles, infectées ou non, sont nourries avec du pollen, dépendant de la qualité de pollen et de la quantité ingérée (Di Pasquale *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). Ainsi, le changement de statut d'abeilles d'intérieur à butineuses serait non seulement dépendant des taux d'HJ et de Vg, mais aussi de l'environnement et de l'état de santé des abeilles.

De plus, l'infection par *N. ceranae* provoquerait une augmentation importante, d'environ 6 fois la quantité d'oléate d'éthyle comparativement aux abeilles non infectées, et ceci de façon corrélée à la charge sporale (Dussaubat *et al.*, 2010, 2013a). Or, cette phéromone est émise par les butineuses pour ralentir le changement de statut des jeunes abeilles nourrices vers celui de butineuses, et permet ainsi de réguler l'équilibre entre la quantité d'abeilles d'intérieur et d'extérieur en fonction des besoins de la colonie. Cette hausse du taux d'OE pourrait donc retarder le changement de statut des abeilles en butineuses et donner une fausse idée des besoins de la colonie, perturbant l'équilibre général de celle-ci. Ceci pourrait être corrélé avec l'augmentation de l'activité de vol observé chez les abeilles infectées et pourrait mettre en avant le fait que les abeilles infectées meurent préférentiellement à l'extérieur de la ruche qu'à l'intérieur.

En plus de son rôle dans le développement de l'individu, la vitellogénine possède des propriétés antioxydantes en piégeant les radicaux libres oxygénés, permettant aux ouvrières et à la reine de conserver de bonnes facultés à effectuer leurs tâches jusqu'à la fin de leur vie (Nelson *et al.*, 2007).

4.4.3. Effet de *N. ceranae* sur l'apprentissage et la mémoire

L'efficacité de butinage des abeilles dépend non seulement de leurs capacités physiques à effectuer le vol, mais aussi de leurs capacités à se repérer, apprendre et mémoriser la source alimentaire et son emplacement afin de restituer ces informations à leurs congénères.

Pour étudier les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation, les chercheurs utilisent généralement le modèle Pavlovien appliqué aux abeilles qui repose sur le réflexe d'extension du proboscis (REP), l'organe de succion des abeilles. Ce modèle est un concept de conditionnement des individus étudiés, classiquement utilisé dans les études de comportement. Inventé par Ivan Pavlov au début du XX^{ème} siècle, le principe consiste à associer un stimulus tel qu'une odeur à un réflexe biologique. Cette réponse est alors récompensée, et lorsque l'association stimulus/réponse/récompense est bien ancrée, l'individu en apprentissage finit par effectuer la réponse avant même de recevoir une récompense (Pavlov, 1954).

Aussi, les abeilles possèdent naturellement le réflexe de tendre leur proboscis en présence de nourriture, en particulier lorsque leurs antennes sont en contact avec des aliments sucrés. La récompense associée au stimulus lors de la phase d'apprentissage est généralement une goutte de sucre. Une étude très récente a porté sur l'étude des effets provoqués par *N. apis* et *N. ceranae*, seuls ou en co-infection, sur l'apprentissage et la capacité de mémorisation des abeilles. Aucune différence dans l'apprentissage ou la mémoire n'a été constatée 7 ou 14 jours après l'infection avec une dose de 625 000 spores par abeille (Charbonneau *et al.*, 2016). Ces résultats ne concordent donc pas avec ceux de Kralj et Fuchs qui indiquent une désorientation des abeilles lorsqu'elles sont infectées par *Nosema* sp. (Kralj & Fuchs, 2010). Cependant, le test REP n'est pas représentatif de l'ensemble des capacités d'apprentissage et de mémorisation des abeilles qui doivent en partie dépendre de la structure sociale de la colonie. De plus, dans l'étude de Charbonneau et collaborateurs, les tests de REP ont été réalisés tandis que les abeilles étaient âgées de 10 et 17 jours, suggérant que la désorientation observée chez les abeilles butineuses dans les colonies infectées se produise plus tardivement.

26

4.5. *N. ceranae* perturbe la physiologie de l'abeille

4.5.1. Effets sur l'intégrité de l'intestin

En dehors de son rôle dans la digestion, l'intestin moyen de l'abeille assure aussi des fonctions de détoxification et d'immunité. Or, il est le siège du développement et de la prolifération de *N. ceranae*. De ce fait, l'intestin moyen peut être altéré par la présence du parasite, conduisant principalement, à des troubles de la fonction digestive (Higes *et al.*, 2007; García-palencia *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012).

Le pathogène peut également avoir un effet négatif sur le système nerveux entérique qui contribue à la régulation de l'absorption des aliments, du péristaltisme intestinal et de son métabolisme.

L'expression de certains gènes codant des canaux voltage-dépendants qui jouent un rôle dans l'homéostasie du Ca^{2+} et du Na^+ , nécessaires à la transmission neuromusculaire, est également inhibée. *N. ceranae* semble donc, par inhibition de l'expression de plusieurs gènes de son hôte, engendrer des dégâts sur l'intestin et son système nerveux (Dussaubat *et al.*, 2012).

La présence de *Nosema* dans l'intestin de l'abeille pourrait également conduire à une perturbation de la composition du microbiote intestinal. Cette question fait l'objet d'une partie de ma thèse et sera exposée dans le Chapitre 4.

4.5.2. *N. ceranae* perturbe-t-il la nutrition de l'abeille ?

Mayack et Naug (2009) ont montré que les abeilles infectées par *N. ceranae* consomment une plus grande quantité de sucre que les abeilles non infectées. Cela se traduirait par une augmentation de l'activité de butinage pour combler un appétit croissant et, dans certains cas, une diminution des comportements de trophallaxie (Mayack & Naug, 2009; Naug & Gibbs, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Smith, 2012). Dans d'autres cas, au contraire, une augmentation de ces échanges a été observée (Lecocq *et al.*, 2016). Cependant, dans certaines études, aucune différence dans la consommation des abeilles infectées par rapport aux abeilles non-infectées n'a été mesurée (Aufauvre *et al.*, 2012, 2014; Basualdo *et al.*, 2014). Le simple suivi de la consommation ne serait donc pas un paramètre pertinent de la mesure de cette perturbation digestive, en raison de sa faible reproductibilité.

C'est pourquoi des analyses de la composition de l'hémolymphe de l'abeille ont également été menées pour tenter d'y déceler les marqueurs d'un stress nutritionnel et/ou énergétique. Ainsi, Aliferis et collaborateurs ont montré que la majorité des acides aminés libres de l'hémolymphe, ainsi que de nombreux glucides qui constituent la principale source d'énergie chez les insectes, sont présents en concentrations plus faibles chez les abeilles infectées (Aliferis *et al.*, 2012). De même, Mayack et Naug ont constaté que le tréhalose, disaccharide non réducteur de glucose, diminuait de moitié dans l'hémolymphe des abeilles infectées (Mayack & Naug, 2010), suggérant une augmentation de son absorption, tandis que la concentration de glucose ne variait pas entre les abeilles infectées et non infectées. Ceci semble corrélé avec une étude montrant que le pathogène induit une augmentation de l'expression du gène codant pour une α -glucosidase intestinale, enzyme permettant la digestion des sucres en monosaccharides (Dussaubat *et al.*, 2012). L'augmentation de l'expression de ce gène suggère donc une élévation de l'absorption du saccharose par séparation du glucose et du fructose qui le composent. L'ensemble de ces éléments pourrait confirmer l'hypothèse d'une augmentation de la demande énergétique de l'abeille pour compenser celle détournée par le pathogène.

Ces différences d'observations et d'évaluation du stress énergétique dans les études pourraient être, là aussi, liées à la génétique des abeilles. En effet, une analyse en HPLC des sucres présents dans

l'hémolymphe des abeilles sensibles et tolérantes à *N. apis* et *N. ceranae* a été réalisée et n'a montré aucune différence de concentration en glucose, fructose et tréhalose chez les abeilles tolérantes infectées par l'une ou l'autre des deux espèces. Aucune différence n'a été mesurée chez les abeilles sensibles à *N. apis*, bien qu'une corrélation négative ait été constatée entre la charge sporale et la concentration de tréhalose. En revanche, les abeilles sensibles à *N. ceranae* ont montré une diminution significative de la concentration en tréhalose, d'environ un facteur 2 par rapport aux abeilles non infectées (Kurze *et al.*, 2016a).

Les effets de *N. ceranae* sur l'état énergétique de son hôte peuvent entraîner des conséquences sur le comportement de celui-ci, en particulier concernant l'activité de vol. En effet, la diminution des concentrations en hydrates de carbone, principale source énergétique pour les muscles alaires, détectée dans l'hémolymphe des abeilles infectées, est susceptible d'affecter leur capacité de vol, (Mayack & Naug, 2010), pouvant être une des explications des perturbations de la fréquence de retours des abeilles à la ruche évoquées précédemment.

4.5.3. Effets à l'échelle moléculaire : perturbations hormonales

Comme il a été décrit précédemment, l'infection par *N. ceranae* induit des perturbations dans sur la production d'oléate d'éthyle chez les abeilles butineuses (Dussaubat *et al.*, 2010, 2013a). Cette infection peut également avoir des effets sur d'autres hormones produites, par les ouvrières ou la reine, au sein de la colonie.

En effet, les hormones permettent à la reine de communiquer avec l'ensemble des individus de la colonie. Par exemple, la phéromone mandibulaire de la reine, appelée QMP pour *Queen Mandibular Pheromone*, permet aux jeunes reines vierges d'attirer les faux-bourdon lors du vol d'accouplement, mais aussi de maintenir une bonne cohésion de la colonie. Les ouvrières peuvent juger l'état de santé et l'âge de la reine en fonction des variations de la production des hormones, en plus de l'abondance de sa ponte, et décider de la remplacer si besoin. La QMP comprend environ 17 composants dont les principaux voient leur production perturbée lors d'une infection par *N. ceranae*. En effet, Alaux et collaborateurs ont constaté que les reines infectées présentaient des taux de 9-ODA (acide 9-oxo-2-décénoïque) et de 9-HDA (acide *cis*-et *trans*-9-hydroxydéc-2-énoïque) significativement plus élevés, tandis que la quantité d'HOB (p-hydroxy- benzoate de méthyle) diminuait d'un facteur 3 par rapport aux reines non infectées (Alaux *et al.*, 2011). Cependant, la question de savoir comment ces variations de quantités de QMP affectent la relation reine/ouvrières reste encore à élucider.

Mayack et collaborateurs ont étudié la variation de deux hormones chez les ouvrières, l'octopamine et l'AKH (*Adipokinetic hormone*). La première hormone agit sur l'apprentissage et les activités de butinage, et la seconde sur les réserves lipidiques, toutes deux semblant associées à des contextes de stress énergétique ou de disette. Lors d'une infection par *N. ceranae*, l'expression des gènes codant

pour l'AKH ne semble pas affectée tandis que celle des gènes codant pour la production d'octopamine et les récepteurs à l'octopamine impliqués dans les activités de butinage semble augmentée (Mayack *et al.*, 2015).

Face à l'ensemble de ces effets négatifs induits par *N. ceranae*, l'abeille dispose de différents niveaux de défense. Mais ceux-ci peuvent aussi être altérés par le parasite. Nous avons précédemment vu l'immunité sociale, à l'échelle de la colonie, voyons maintenant comment l'abeille peut se défendre à l'échelle de l'individu, au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire.

4.6. L'abeille face à *Nosema*

4.6.1. L'abeille, taillée pour se défendre

Comme la majorité des insectes, l'abeille possède différentes barrières pour se défendre des attaques par des agents pathogènes. La première ligne de défense réside dans leur anatomie par la présence d'un exosquelette, la cuticule, ainsi que d'une membrane (ou matrice) péritrophique au niveau de la lumière intestinale (Antúnez *et al.*, 2009).

La cuticule des arthropodes, et notamment celle des abeilles, est formée de trois couches : (i) la plus externe nommée épicuticule, est une couche de cire et de lipoprotéines imperméable à l'eau, limitant la déshydratation de l'insecte ; (ii) la couche médiane, l'exocuticule, est principalement constituée de sclérotine (protéine tannée) responsable de la rigidité de la cuticule ainsi que de quelques molécules de chitine et de mélanine ; (iii) la couche la plus profonde, l'endocuticule, est constituée de différentes protéines associées à la chitine, la rendant plus flexible. La présence de poils de tailles et de formes différentes confère également une barrière physique contre les agressions.

La membrane péritrophique est une structure anatomique qui entoure le bol alimentaire chez la plupart des insectes. Elle est constituée de protéines, les péritrophines, entrelacées de molécules de chitine (Bolognesi *et al.*, 2008). Secrétée par les entérocytes du ventricule, elle est formée chez l'abeille quelques jours avant l'émergence (Verbeke *et al.*, 1985). Ainsi, la présence de la membrane permet de remplacer l'absence de mucus dans l'intestin des insectes. Cependant, cette matrice semble fortement altérée en présence du parasite (García-palencia *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012).

Aussi, ces différentes structures constituent des barrières physiques contre les agents pathogènes, tantôt en empêchant leur pénétration et en limitant les dommages mécaniques qu'ils provoquent, tantôt en les piégeant.

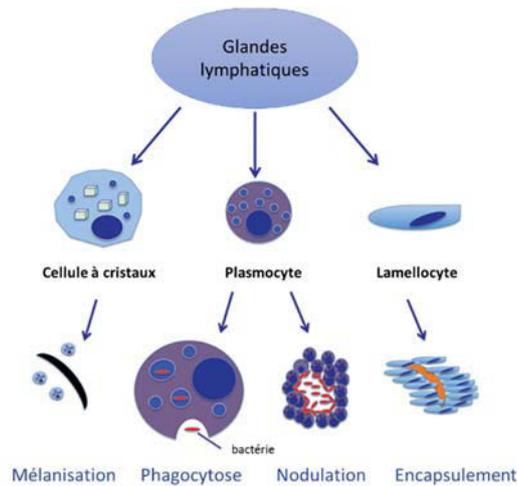


Figure 24. Principaux hémocytes présents dans l'hémolymphe des insectes et fonctions. Il existe un très grand nombre de réponses immunitaires cellulaires chez les insectes en fonctions des espèces. Cependant, certains mécanismes sont fréquemment retrouvés, en particulier la mélanisation (production de phénol oxydase aboutissant à la formation de mélanine), la phagocytose (ingestion et destruction de grandes particules), la nodulation (se déroulant en soutien de la phagocytose par formation d'agrégats d'hémocytes) et l'encapsulation (agglutination en plusieurs couches autour des parasites de grandes tailles). La classification des hémocytes est, à l'heure actuelle, basée sur leur morphologie et ne correspond pas toujours bien aux différentes fonctions cellulaires existantes. Trois types cellulaires sont régulièrement retrouvés chez les insectes : les cellules à cristaux, les plasmocytes (hémocytes majoritaires) et les lamellocytes (présents au stade larvaire). Les schémas des hémocytes ne sont pas à l'échelle (d'après Rosales, 2017).

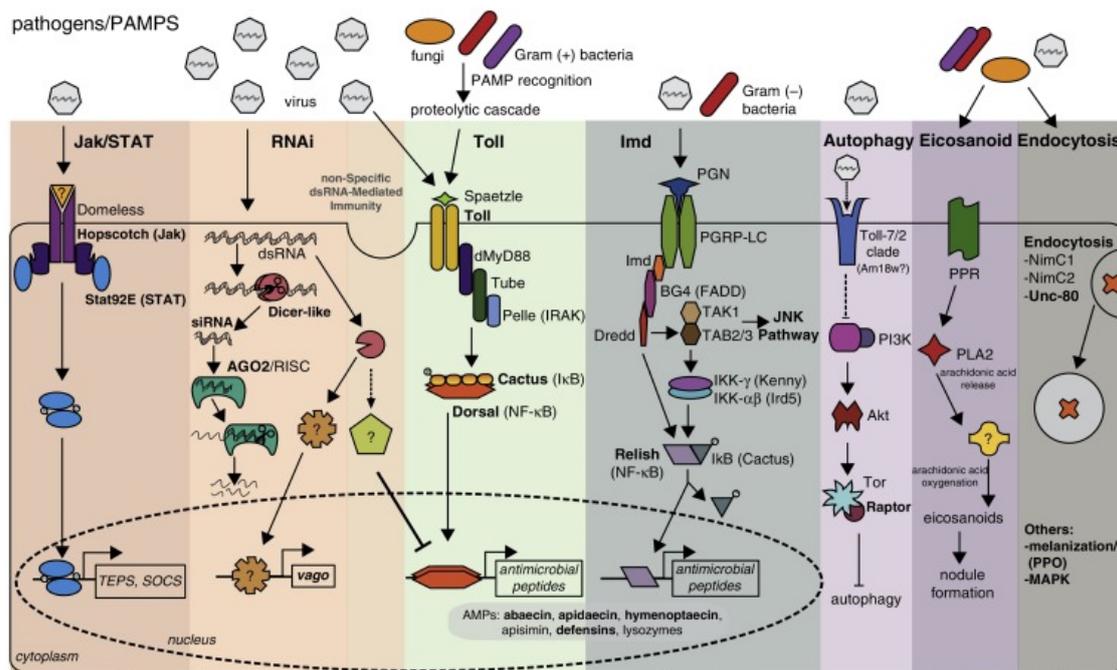


Figure 25. Les différentes voies immunitaires chez l'abeille. Le génome de l'abeille code pour les principales voies de l'immunité précédemment décrites chez les insectes, y compris les voies : RNAi (ARN interférence) ; Jak / STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) ; Toll ; NF-κB (*Nuclear Factor κB*) ; JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) ; et MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), ainsi que les orthologues des gènes impliqués dans l'autophagie, la biosynthèse d'eicosanoïde (acide gras impliqué dans le phénomène de migration des hémocytes et de la nodulation), l'endocytose et la mélanisation. La production des peptides antimicrobiens (AMPs) de l'abeille (abaécine, apidaécine, hyménoptaécine et défensine) résulte de l'activation de la voie Toll et Imd (*Immune deficiency*) (d'après Brutscher *et al.*, 2015).

4.6.2. Immunité cellulaire

L'immunité innée constitue la seconde ligne de défense des insectes, ces derniers ne possédant pas d'immunité adaptative. Elle est composée de l'immunité cellulaire et de la réponse humorale. La réponse cellulaire, plus rapide que la réponse humorale (Rosales, 2017), est effectuée par les hémocytes, équivalents des phagocytes chez les invertébrés, circulant en très grand nombre dans l'hémolymphe. Elle est caractérisée par des processus de défense tels que la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation qui sont souvent accompagnés d'une mélanisation catalysée par une phénol oxydase (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Antúnez *et al.*, 2009; Texier *et al.*, 2010) (Figure 24). Il a été démontré que l'activité de la phénol oxydase augmente au cours de la vie des abeilles, tandis que le nombre d'hémocytes diminue avec le temps, de façon différente selon la caste étudiée (Schmid *et al.*, 2008). De plus, elle nécessite également la contribution d'une glucose déshydrogénase durant l'encapsulation et l'élimination de champignons pathogènes. Étonnamment, le nombre total d'hémocytes et de phénol oxydase n'augmente pas chez les abeilles infectées par *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010), alors que l'expression du gène codant pour la phénol oxydase augmente en présence de *N. apis* 7 jours post-infection (Antúnez *et al.*, 2009).

4.6.3. Immunité humorale

À l'échelle moléculaire, l'infection par *Nosema* entraîne des perturbations de l'expression de gènes et de l'activité de certaines enzymes au niveau des cellules intestinales. Les principaux gènes dont l'expression est modifiée au cours de l'infection sont impliqués dans le métabolisme énergétique, la production de peptides antimicrobiens, le renouvellement cellulaire ou encore le stress oxydant (Antúnez *et al.*, 2009; Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012; Chaimanee *et al.*, 2012; Dussaubat *et al.*, 2012).

La réponse humorale chez les insectes est en partie réalisée par la production de peptides antimicrobiens (PAM) réquisitionnés pour lutter contre les attaques virales, bactériennes, fongiques et parasitaires (Figure 25), en altérant par exemple la perméabilité des membranes bactériennes. Chez *Apis mellifera*, quatre peptides microbiens ont été décrits : la défensine, l'abaécine, l'apidaécine et l'hyménoptaécine (Brutscher *et al.*, 2015). Il a été montré qu'au cours d'une infection par *N. ceranae*, l'expression des gènes codant pour ces PAM était significativement inhibée (Antúnez *et al.*, 2009; Dussaubat, 2012), particulièrement dans les premiers jours suivant l'infection (Chaimanee *et al.*, 2012), empêchant l'hôte de se défendre contre le parasite par ce biais et le rendant plus sensible aux autres agents pathogènes.

De façon complémentaire à la production de PAM, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, fait partie intégrante de la réponse humorale. Les ERO

peuvent être produites à différents moments durant la réponse cellulaire, comme par exemple, lors de la phagocytose, ou libérées avant même l'action des cellules immunitaires⁷.

Aussi, l'étude menée par Dussaubat *et al.* en 2012, a montré qu'un grand nombre de gènes de l'abeille impliqués dans la signalisation cellulaire est inhibé par l'infection. Or, les systèmes de signalisation permettent aux cellules de saisir les informations de leur environnement et d'y répondre de façon adaptée, tout au long de la vie d'un tissu. Ceci est essentiel pour son développement, son maintien et son renouvellement qui permettent de garantir son homéostasie. En outre, l'épithélium intestinal des insectes se régénère par différenciation et migration des cellules basales de l'épithélium jusqu'à la partie apicale du côté de la lumière intestinale (Higes *et al.*, 2007). Ce mécanisme est régulé par la voie de signalisation Wingless qui serait inhibée par *N. ceranae* au cours de l'infection (Dussaubat *et al.*, 2012).

Le mécanisme de mort cellulaire programmée, ou apoptose, peut également être un moyen de défense de l'hôte utilisé contre l'agent pathogène pour limiter sa prolifération comme suggéré par James et Green (James & Green, 2002). Parfois, l'apoptose peut être déclenchée par le parasite lui-même pour provoquer sa propre libération. Mais il semblerait cependant, qu'en plus de limiter la régénération de l'épithélium, conduisant pourtant *in fine* au détachement des cellules, que *N. ceranae* inhibe la machinerie apoptotique de son hôte pour favoriser sa multiplication. En effet, des marquages des cellules de l'épithélium intestinal au TUNEL (marqueur de l'ADN fractionné lors de l'apoptose) a permis de montrer une plus faible quantité de cellules en apoptose chez les abeilles infectées par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2013a; Kurze *et al.*, 2015). De surcroît, les abeilles tolérantes ne présentent pas de différence significative avec les abeilles non infectées contrairement aux abeilles sensibles. Il semblerait que *N. ceranae* induise une augmentation de l'expression du gène codant pour une protéine régulant l'apoptose, IAP-2, chez les abeilles sensibles. Cette protéine est une homologue de la protéine anti-apoptotique DIAP-1 de la drosophile (Kurze *et al.*, 2015). Higes et collaborateurs ont également estimé, à l'aide d'un anticorps anti-caspase-3 (protéase impliquée dans le processus apoptotique), que le tissu intestinal des abeilles infectées semblait présenter moins de cellules en apoptose que celui des abeilles saines. Leurs résultats sont toutefois à prendre avec précaution, puisqu'ils sont basés uniquement sur des observations histologiques et sont à confirmer par des mesures moléculaires, Kurze et collaborateurs n'ayant pas mesuré de différence significative de l'expression des gènes *casp-2* et *casp-10*.

De plus, chez d'autres insectes comme la drosophile, il existe un mécanisme d'autophagie, consistant à décomposer le cytoplasme par la voie de dégradation lysosomale. Ce processus se produit en réponse à un stress, tel que le stress énergétique, afin de recycler les macromolécules de la cellule.

⁷ Le rôle des ERO sera détaillé dans la partie « Stress oxydant » de ce Chapitre 1.

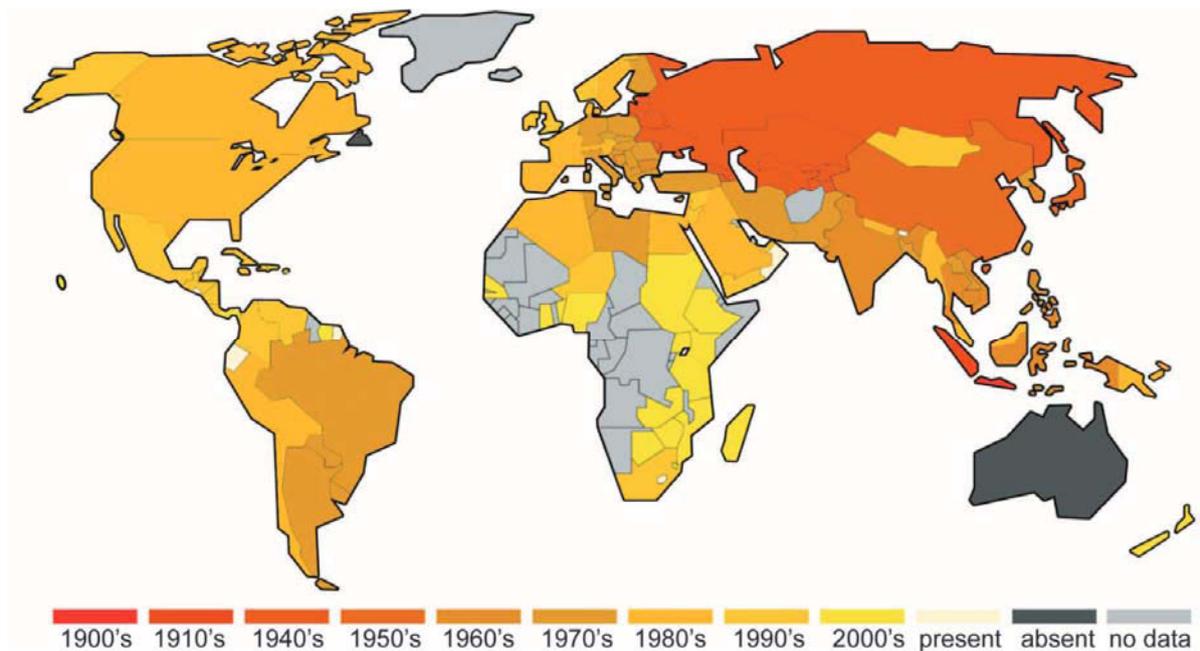


Figure 26. Evolution de la propagation de l'acarien parasite *Varroa destructor* chez l'abeille *Apis mellifera*. La distribution temporelle de *V. destructor* chez *A. mellifera* a été basée sur les premiers enregistrements estimés par pays. À l'heure actuelle, les seuls grands espaces possédant un grand nombre de colonies et où *Varroa* est absent sont l'Australie et Terre-Neuve. De plus en plus de données indiquent que l'Afrique subsaharienne a été envahie par le parasite depuis le début du siècle (d'après Wilfert *et al.*, 2016).

L'autophagie a également été démontrée comme un mécanisme de défense contre les agents pathogènes intracellulaires, mais il est possible que certains aient la capacité d'inhiber, d'éviter ou d'utiliser ce processus pour leur propre développement (Moy & Cherry, 2014). Un tel mécanisme durant l'interaction *N. ceranae/A. mellifera* n'a jamais été décrit dans la littérature, alors qu'il a par exemple déjà été observé dans le cas de l'infection des larves d'abeilles par la bactérie *Paenibacillus larvae*, l'agent de la loque américaine (Gregorc & Bowen, 1998).

4.7. Les interactions avec *Nosema*

Puisque les chercheurs s'accordent à dire que le déclin de l'état de santé des abeilles est dû à des interactions de plusieurs facteurs de stress, beaucoup d'études ont porté sur l'interaction entre *Nosema* et d'autres perturbateurs biotiques et/ou abiotiques tels que les virus, les parasites ou encore les molécules chimiques.

4.7.1. *Nosema* et les acariens

Deux principales familles d'acariens parasitent les abeilles ouvrières, les reines et les faux-bourdon : les Varroidés, les Laelapidés *Tropilaelaps clareae* et *Acarapis woodi*, de la famille des Tarsonemidés (Sammataro, 2012). Tous se nourrissent de l'hémolymphe de leur hôte, mais le parasitisme est externe dans les deux premiers cas où les parasites se développent sur le couvain, alors que *A. woodi* est un endoparasite qui infeste les voies respiratoires, les trachées, des abeilles adultes.

L'interaction la plus fréquemment étudiée chez les abeilles domestiques est l'interaction *Nosema/Varroa*. En effet, *Varroa* est le parasite le plus prédominant dans les colonies, et est catégorisé comme danger sanitaire de niveau 2 (Annexe 3). Il existe quatre espèces de *Varroa* parasitant les abeilles, mais les plus décrits sont *V. jacobsoni* et *V. destructor*, souvent confondus du fait de leur forte ressemblance morphologique. À l'origine parasite de l'abeille asiatique *Apis cerana*, tout comme *N. ceranae*, *V. destructor* est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde et est présente en France depuis les années 1980 (Figure 26), faisant de lui l'acarien majoritairement étudié. Bien qu'il soit connu pour être un vecteur important pour certains virus, *V. destructor* ne semble pas véhiculer *Nosema* d'une abeille à l'autre, ce dernier ne circulant visiblement pas dans l'hémolymphe des abeilles.

Une étude a montré que la présence de *Nosema* spp. chez l'abeille mellifère ibérique pouvait diminuer l'efficacité du traitement acaricide Apivar®, largement utilisé en apiculture pour lutter contre *Varroa destructor* (Botías et al., 2012), entraînant de ce fait une augmentation de la mortalité des abeilles atteintes par ces deux pathogènes.

Tableau 3. Virus présents chez les abeilles domestiques européennes. NC : Non Classé ; sb : simple brin ; db : double brin ; ARN+ : ARN à polarité positive (sens). (D'après Aubert *et al.*, 2008, révisé par Coulon M.)

Virus	Nom anglais	Nom français	Classification	Matériel génétique	Modes de transmission et association
FV	<i>Filamentous Virus</i>	Virus filamenteux	<i>Baculavirus</i> (?)	ADN db	Horizontale <i>per os</i> . Souvent associé à <i>N. apis</i> .
ABPV	<i>Acute Bee Paralysis Virus</i>	Virus de la paralysie aiguë de l'abeille	<i>Dicistroviridae</i>	ARN+ sb	Horizontale <i>per os</i> et <i>via V. destructor</i> . Probablement verticale. <i>Ces trois virus (complexe "AKI") sont très proches génétiquement.</i>
KBV	<i>Kashmir Bee Virus</i>	Virus du Cachemire (paralysie aiguë)			
IAPV	<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>	Virus de la paralysie aiguë Israélienne			
BQCV	<i>Black Queen Cell Virus</i>	Virus de la cellule royale noire			Horizontale <i>per os</i> ou dans l'alimentation des larves. Dépend de <i>N. apis</i> chez les ouvrières.
SBPV	<i>Slow Bee Paralysis Virus</i>	Virus de la paralysie lente	<i>flaviridae</i>	ARN	Horizontale <i>per os</i> . Potentiellement verticale.
DWV	<i>Deformed Wing Virus</i>	Virus des ailes déformées	<i>iflavirus</i>	ARN+ sb	Horizontale <i>per os</i> et <i>via V. destructor</i> . Verticale.
AIV	<i>Apis Iridescent Virus</i>	Virus iridescent de l'abeille	<i>Iridovirus</i>	ADN	Potentiellement horizontale.
SBV	<i>SacBrood Virus</i>	Virus du couvain sacciforme	<i>Picornaviridae</i>	ARN	Forte présomption d'une transmission horizontale. <i>Via V. destructor</i> .
CBPV	<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>	Maladie noire - paralysie chronique	NC - proche <i>Tombusviridae</i> et <i>Nodaviridae</i>	ARN+ sb	Horizontale par contact et <i>per os</i> . Verticale.
BVX	<i>Bee Virus X</i>	Virus X de l'abeille	NC	ARN sb	Horizontale <i>per os</i> . Souvent associé à <i>M. mellifica</i> .
BVY	<i>Bee Virus Y</i>	Virus Y de l'abeille	NC	ARN	Horizontale <i>per os</i> . Souvent associé à <i>N. apis</i> .
CWV	<i>Cloudy Wing Virus</i>	Virus de l'aile trouble	NC	ARN	Potentiellement horizontale <i>per os</i> et <i>via V. destructor</i> .

4.7.2. *Nosema* et les virus

Plusieurs virus sont présents au sein de la ruche (Tableau 3) et certains d'entre eux peuvent être transmis par *Varroa* (Aubert *et al.*, 2008; Nazzi & Le Conte, 2016).

Différentes recherches ont été menées ces dernières années sur les effets des co-infections *Nosema*-virus, avec parfois des effets synergiques sur la mortalité des abeilles. En effet, l'association *N. ceranae* et CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*), un virus responsable de la « maladie noire » de l'abeille, a montré une augmentation de la réplication du virus ainsi que de la mortalité des individus co-infectés (Toplak *et al.*, 2013). Une surmortalité des abeilles co-infectées a également été observée comparativement aux abeilles infectées par le virus ou par le parasite (Bromenshenk *et al.*, 2010).

De la même façon, dans l'étude de Doublet *et al.*, une co-infection par *N. ceranae* et le virus BQCV (*Black Queen Cell Virus*) a doublé la mortalité des abeilles, comparativement aux abeilles uniquement infectées par le parasite. La mortalité des abeilles co-infectées a augmenté d'un facteur huit par rapport aux abeilles exposées au virus seul. Toutefois, la charge parasitaire et le nombre de copies du virus ne semblent pas varier entre les abeilles mono- et co-infectées (Doublet *et al.*, 2014).

Le virus des ailes déformées, connu sous le nom de DWV (*Deformed Wing Virus*), est l'un des virus les plus fréquemment retrouvés dans les colonies d'abeilles domestiques, bien qu'il ne soit pas considéré comme danger sanitaire (Annexe 3). Il est transmis verticalement par les reines et les mâles ou horizontalement par les acariens du genre *Varroa* et *Tropilaelaps* (Evans & Spivak, 2010). Comme son nom l'indique, ce virus engendre des malformations alaires lors de la nymphose. Ainsi les abeilles aux ailes atrophiées ne survivent pas longtemps et peuvent même être expulsées hors de la ruche par leurs congénères. Plusieurs études ont porté sur l'effet combiné de DWV et de *N. ceranae*, mais des résultats contradictoires ont cependant été observés. En effet, aucune corrélation entre la charge virale et la charge parasitaire n'a été observée dans l'étude de Martin *et al.* (Martin *et al.*, 2013), tandis que Zheng *et al.* suggèrent que *N. ceranae* pourrait accélérer la réplication des virus, et ceci de manière plus accrue si les abeilles sont nourries avec du pollen (Zheng *et al.*, 2015). Cependant, Zheng et collaborateurs soumettent l'hypothèse que l'effet synergique observé resterait dépendant des charges virales et parasitaires ainsi que de l'apport nutritionnel. Doublet *et al.* suggèrent quant à eux un impact négatif du parasite sur la propagation du virus (Doublet *et al.*, 2015).

Enfin, aucune interaction n'a été signalée entre *Nosema ceranae* et le virus IAPV (*Israeli Acute Paralysis Virus*), dit virus de la paralysie aiguë, lors des travaux menés par Cox-Foster *et al.* en 2007 (Cox-foster *et al.*, 2007).

4.7.3. *Nosema*, les bactéries et autres champignons

Deux espèces bactériennes engendrent des perturbations majeures dans les colonies d'abeilles, en provoquant notamment des dégâts au niveau du couvain : *Paenibacillus larvae*, responsable de la

loque américaine de danger sanitaire de niveau 1, et *Melissococcus plutonius*, agent de la loque européenne de danger sanitaire de niveau 3 (Annexe 3). *P. larvae* se propage *via* des spores de résistance et infecte les jeunes larves par voie orale pour se développer au niveau de l'intestin. Bien que ces maladies soient fréquemment répandues, peu d'études ont abordé la question de la co-exposition des colonies à *Nosema* et ces bactéries pathogènes. Or, *Nosema* étant souvent considéré comme un parasite opportuniste, sa présence dans des colonies affaiblies par la loque ne serait pas surprenante.

À ce propos, certaines études suggèrent aussi une corrélation entre la nosérose et la présence du champignon *Ascosphaera apis*, agent à l'origine du couvain plâtré (Annexe 3). En effet, Aydin et collaborateurs ont montré que où 56% des 168 colonies étudiées présentaient une co-infection *Nosema* sp./*A. apis* (Aydin *et al.*, 2006). Ainsi, la présence de *Nosema* dans les colonies atteintes d'une maladie de couvain illustre l'opportunisme de ce parasite pour des colonies affaiblies.

4.7.4. *Nosema* et les autres endoparasites

Des endoparasites, autres que les microsporidies, sont également retrouvés chez les abeilles. Très rarement observés seuls, ils sont majoritairement retrouvés en concomitance avec *Nosema*. Il n'est pas rare en effet de constater la présence de parasites de la famille des Trypanosomatidés.

C'est le cas de *Crithidia mellificae* qui se développe dans le tractus digestif des abeilles. Une altération de la production de peptides antimicrobiens et une diminution de la réponse immunitaire ont été démontrées lors d'une co-infection *N. ceranae*/*C. mellificae*, sans pour autant provoquer une surmortalité des abeilles co-infectées (Schwarz & Evans, 2013). Ce dernier point a été appuyé par une récente étude ne montrant pas plus de mortalité chez les abeilles co-infectées que chez les abeilles uniquement infectées par *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2016). Des études épidémiologiques suggèrent pourtant un lien entre la présence de ces pathogènes et la perte de colonies aux Etats-Unis (Runckel *et al.*, 2011) ou en Belgique (Ravoet *et al.*, 2013), montrant l'importance de la prise en compte de plusieurs facteurs dans les phénomènes de pertes de colonies. La corrélation entre *Nosema* et les autres endoparasites intestinaux n'est cependant pas systématique puisqu'une récente étude a montré qu'il n'existait probablement pas de réelle interaction entre le parasite *Lotmaria passim* (un Leshmaniiné Trypanosomatidé) et *N. ceranae* (Tritschler *et al.*, 2017).

Les abeilles peuvent également être atteintes d'amibiase au niveau des tubes de Malpighi, appareil excréteur des insectes. Cette maladie, qui est provoquée par le protozoaire *Malpighamoeba mellificae* appelé aussi *Malpighiella mellificae*, semble souvent combinée à la nosérose en particulier en association avec *N. apis*. En Turquie, 30% des colonies infectées par *Nosema* sp. étaient co-infectées par *M. mellificae* (Aydin *et al.*, 2006).

4.7.5. *Nosema* et les pesticides

Une étude menée dans les années 1970 s'était déjà penchée sur la problématique toxicopathologique des abeilles infectées par *N. apis* et exposées par contact à l'organochloré dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou par ingestion de l'organophosphate trichlorfon, connu à l'époque sous le nom de Dipterex® (Ladas, 1972). Les résultats montraient une sensibilité accrue des abeilles à ces molécules, chez les jeunes individus et les individus infectés par *N. apis*.

Ces dernières années, de nombreuses études ont été réalisées sur les interactions toxiques/pathogènes et notamment sur les interactions insecticides/*N. ceranae*. Ces études ont pour but de mieux comprendre les effets de ces combinaisons et de répondre aux questions suivantes : les parasites sensibilisent-ils les abeilles aux insecticides et/ou les insecticides affaiblissent-ils les abeilles qui deviennent plus sensibles aux infections par les agents pathogènes. Plusieurs études nous apportent des éléments de réponse.

Tout d'abord, il a été montré lors d'études, menées tant en laboratoire qu'en plein champ, que la présence de *N. ceranae* pouvait sensibiliser les abeilles aux pesticides (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014, Pettis *et al.*, 2012, 2013; Wu *et al.*, 2012; Retschnig *et al.*, 2014). Plusieurs molécules ont ainsi été testées en présence de *Nosema* et ont montré une augmentation de la mortalité des abeilles lors d'une co-exposition, en présence de néonicotinoïdes, tels que l'imidaclopride (Alaux *et al.*, 2010; Aufauvre *et al.*, 2014), ou le thiaclopride (Vidau *et al.*, 2011a; Retschnig *et al.*, 2014; Doublet *et al.*, 2015) ou en présence du fipronil, un insecticide de la famille des phénylpyrazoles (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014).

Des études ont également été menées en pré-exposant les abeilles aux pesticides et ont montré une augmentation de la sensibilité des abeilles à l'infection par *N. ceranae* (Pettis *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). En présence de fipronil, Aufauvre et collaborateurs ont montré une augmentation synergique de la mortalité des abeilles, quelle que soit la combinaison temporelle testée, que celles-ci soient exposées dans un premier temps à l'insecticide puis au parasite, à la combinaison inverse ou de manière simultanée. De plus, cette synergie était observée, que les abeilles soient exposées à la combinaison des deux facteurs à l'émergence, ou 7 jours après émergence (Aufauvre *et al.*, 2012). Il semblerait donc que des abeilles exposées à un facteur soient sensibilisées au second, dans un ordre ou dans l'autre.

Les ouvrières ne sont pas les seuls individus sensibles aux co-expositions. En effet, une augmentation de la mortalité des reines infectées par *N. ceranae* et exposées à l'imidaclopride a été décrite plus récemment (Dussaubat *et al.*, 2016).

4.8. Modulation de la virulence et moyens de lutte

Etudié depuis de nombreuses années contre la nosérose des abeilles (Katznelson & Jamieson, 1952), l'antibiotique fumagilline, aujourd'hui commercialisé sous le nom de Fumidil B[®], demeure le seul traitement réellement efficace. L'efficacité avérée de celui-ci demeure cependant relatif puisque le traitement agit sur la forme végétative de la microsporidie mais ne semble avoir aucun effet sur la forme sporale (Reybroeck *et al.*, 2012; Roussel *et al.*, 2015). Utilisé depuis les années 70 dans l'Union européenne, plusieurs états membres de l'UE ont à l'heure actuelle interdit l'utilisation de la fumagilline comme moyen de traitement de la nosérose des abeilles du fait de l'absence de limite maximale de résidus (LMR) dans le dossier d'AMM (Commission européenne, 2010; Reybroeck *et al.*, 2012). Ainsi, le Fumidil B[®] ne figure pas dans la liste des médicaments vétérinaires autorisés en France. De façon plus généralisée, il n'existe pas de LMR pour les antibiotiques dans le miel, la gelée royale et le pollen. Leur usage en apiculture est donc interdit en France (ITSAP, 2014). Les LMR, qui dans le cadre de médicaments vétérinaires, sont définies comme un seuil réglementaire « tenant compte de la toxicité de la substance et de l'exposition possible du consommateur de denrées »⁸, sont fixées par décision de la Commission européenne, basée sur les études menées par l'Agence Européenne du Médicament. Ainsi, en France, des solutions alternatives se sont développées et ont été expérimentées.

36

L'acide oxalique, utilisé sur les populations d'abeilles hivernantes pour lutter contre *Varroa*, a également été testé en laboratoire contre *N. ceranae*. Les abeilles ont été exposées chroniquement durant 8 jours à 0,25M d'acide oxalique introduit dans le sirop de nourrissage et le dénombrement des parasites a révélé une diminution significative de la charge sporale dès le 6^{ème} jour de traitement, avec environ 3 fois moins de spores 7 jours post-infection (Nanetti *et al.*, 2015). L'utilisation de l'acide oxalique par fumigation a également été testée sur des colonies infectées par *Nosema* sp., mais les auteurs restent prudents quant à l'interprétation des résultats. En effet, bien qu'une tendance se dessinait en faveur d'une diminution de la charge parasitaire, elle n'était pas significativement différentes des groupes non traités, et la capacité infectieuse des spores prélevées chez les abeilles traitées n'a pas été éprouvée (Underwood & Currie, 2009). De même, une complémentation en thymol ou en resvératrol dans les apports de sucres aux abeilles infectées artificiellement par *N. ceranae* et maintenues en cagettes a montré une amélioration de la survie des abeilles. Cependant, seul le thymol présentait une diminution significative de 44% de la charge sporale (Costa *et al.*, 2010).

Au laboratoire, Roussel et collaborateurs ont publié en 2015 les résultats d'une étude basée sur l'utilisation préventive de glycosaminoglycanes pour prévenir et/ou limiter l'infection par *N. ceranae*

⁸ <https://www.anses.fr/fr/content/limites-maximales-de-r%C3%A9sidus-ou-lmr-de-m%C3%A9dicament-v%C3%A9t%C3%A9rinaire>. Consulté le 09 janvier 2017.

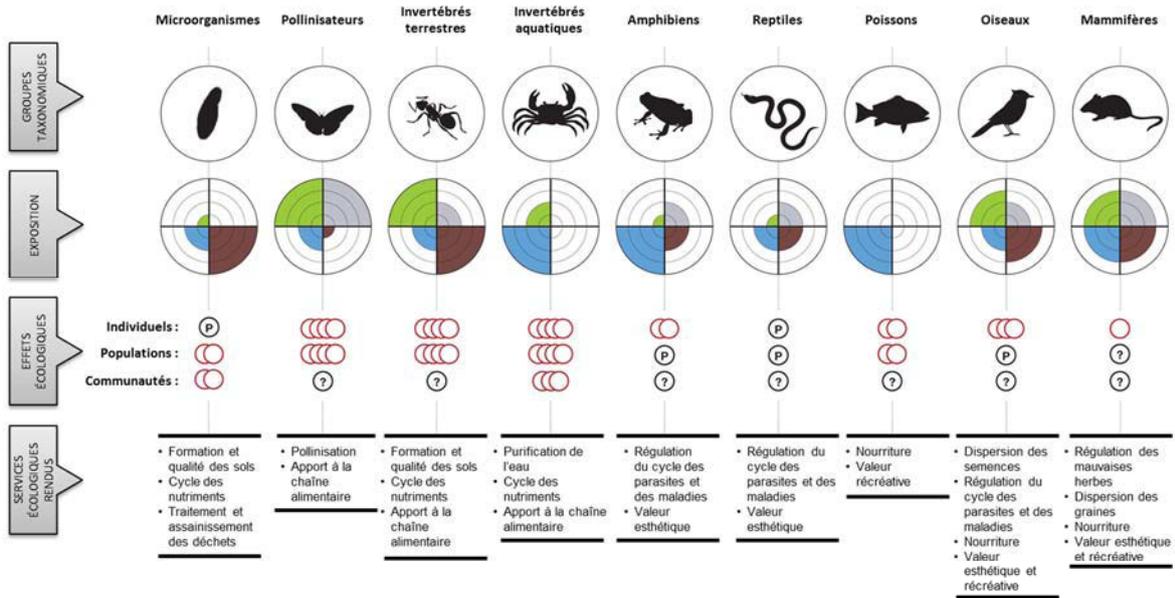
(Michaud *et al.*, 2013; Roussel *et al.*, 2015). Les résultats ont montré que certains polysaccharides sulfatés extraits de macro- et de micro-algues amélioreraient la survie des abeilles infectées et réduisaient la charge sporale chez les abeilles infectées.

D'autres études ont montré que le type d'alimentation pouvait jouer un rôle important dans le cas d'infection par *N. ceranae*. En effet, la survie des abeilles infectées est améliorée lorsqu'elles sont nourries avec du pollen, riche en protéines (Di Pasquale *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014; Jack *et al.*, 2016). Toutefois, d'autres études ont également mis en évidence une corrélation positive entre la quantité de pollen et la charge parasitaire (Zheng *et al.*, 2014; Fleming *et al.*, 2015; Jack *et al.*, 2016). Une expérimentation similaire menée au laboratoire en 2016 a montré une diminution de la survie des abeilles infectées par *N. ceranae* et nourries au pollen par rapport aux abeilles infectées nourries sans pollen (Dubuffet, communication personnelle). De plus, 14 jours post-infection, la charge parasitaire chez les abeilles infectées par *N. ceranae* et nourries au pollen avait triplé par rapport à celle des abeilles infectées sans pollen (Données non publiées).

Enfin, l'utilisation de probiotiques⁹ comme moyen de lutte et de prévention contre la nosérose est à l'étude depuis quelques années. Les principales utilisations des probiotiques visent entre autre à produire des substances inhibitrices contre les agents pathogènes, empêcher leur attachement à la paroi intestinale, et/ou stimuler le système immunitaire. L'utilisation des probiotiques pour accroître la résistance aux maladies et améliorer la santé globale de l'Homme et des animaux terrestres est établie depuis longtemps, mais leur utilisation et leur efficacité en apiculture sont à l'heure actuelle encore peu documentées. L'utilisation de *Lactobacillus rhamnosus*, un probiotique commercial initialement utilisé chez les vertébrés, n'aurait aucun effet, voire même sensibiliserait les abeilles à l'infection par *N. ceranae* et diminuerait leur taux de survie (Ptaszyńska *et al.*, 2016a).

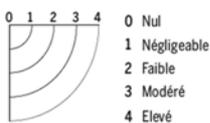
Plusieurs produits commerciaux vendus pour renforcer les colonies sont disponibles sur le marché (ApiHerb, HoneyBHealthy®, Vita Feed Gold, Nozevit, HiveAlive™), mais l'efficacité contre *Nosema* sp. est mal documentée et peu ou non prouvée. En attendant une solution médicamenteuse concrète pour lutter contre la nosérose, l'ITSAP et l'ANSES recommandent aux apiculteurs de mettre en place des mesures prophylactiques : une tenue propre du rucher, l'isolation voire l'élimination des colonies faibles ou malades, la réduction des comportements de pillages entre colonies, la diminution des risques de contamination (notamment de la nourriture) en évitant de mélanger les colonies et d'écraser les abeilles lors des manipulations (ITSAP, 2014; ANSES, 2015). Ces mesures, de façon générale, peuvent permettre de prévenir les colonies de différentes maladies.

⁹ Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, « consommés en quantité suffisante dans l'alimentation, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte ».



EXPOSITION

Niveau d'exposition aux pesticides systémiques (néonicotinoïdes ou fipronil)



Voies d'exposition



EFFETS ÉCOLOGIQUES

- 1: Effets potentiels supposés négligeables dans des conditions d'exposition normales
- 2: Effets indésirables pouvant se produire à des doses élevées ou suite à une exposition prolongée
- 3: Effets probants pouvant se produire à des doses modérées
- 4: Effets probants pouvant se produire à de faibles doses ou suite à une exposition aiguë
- ? 5: Inconnu : aucun jugement rendu par manque de données ou données indisponibles
- P 6: Probable : aucun jugement précis en raison de preuves incomplètes mais les données suggèrent un effet potentiel

Figure 27. Effets écologiques de l'exposition aux pesticides systémiques sur différentes classes d'organismes selon différentes voies d'exposition. Contrairement aux pesticides qui restent sur la surface du feuillage traité, les pesticides dits systémiques (le fipronil et les néonicotinoïdes) sont absorbés par la plante. Ils circulent dans le système vasculaire et migrent ainsi dans tous les tissus (feuilles, fleurs, racines et tiges), et peuvent aussi se retrouver dans le pollen et le nectar, exposant les organismes terrestres, aquatiques et aériens à ces molécules toxiques (traduit d'après The Worldwide Integrated Assessment of the Impact of Systemic Pesticides on Biodiversity and Ecosystems, Task Force on Systemic Pesticides, 2014).

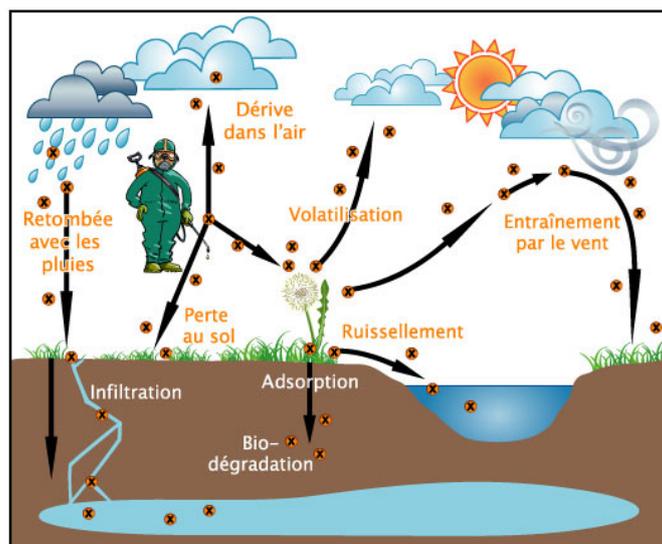


Figure 28. Contamination des différents compartiments environnementaux par les pesticides. L'utilisation massive des pesticides engendre la contamination des différents compartiments environnementaux, à savoir l'eau, l'air et le sol (Vidau, 2009).

Les pesticides : impacts sur la santé des abeilles

Il semble *a priori* difficile d'anticiper le devenir et l'impact d'un polluant sur un processus biologique, parfois-même en ayant des molécules et des systèmes modèles. En effet, la définition même d'un écosystème, caractérisé par le biotope et la biocénose qui le constituent, mais surtout par les transferts d'énergie et de matière entre ces derniers, rend complexe la prédiction du devenir des polluants d'une part et de l'écosystème d'autre part.

En effet, la grande diversité de polluants, en termes de molécules mères mais aussi de formulation commerciale, de propriétés physico-chimiques, et de doses utilisées, rend difficile la comparaison des effets des différentes molécules sur un écosystème. À l'inverse, les réactions d'un écosystème sur une molécule (dégradation, persistance, rémanence du produit...) peuvent varier en fonction de l'écosystème.

Dans cet « imbroglio moléculaire » constitué par les polluants environnementaux, certaines classes de molécules forcent naturellement à la suspicion (Vidau, 2009). Seulement, toutes les études ne se retrouvent pas lorsqu'il s'agit d'incriminer une molécule en particulier concernant son impact avéré ou non sur un organisme. Mais force est de constater, grâce notamment aux études écologiques, toxicologiques, ou épidémiologiques, qu'une catégorie de molécules se détache particulièrement quant aux effets néfastes sur l'environnement et les organismes : les pesticides¹⁰.

Ainsi, les pesticides de par leur nature à induire des perturbations physiologiques voire des pathologies notamment chez l'Homme, ont largement été étudiés et beaucoup de recherches sont portées sur les modes d'exposition des organismes. Un grand nombre d'entre elles montrent que la présence de ces pesticides, notamment les pesticides systémiques, dans l'environnement a également un impact négatif sur la santé des organismes non-cibles tels que des microorganismes terrestres et aquatiques, des amphibiens, des annélides ou des arthropodes (Figure 27).

1. Devenir des pesticides dans l'environnement

Le premier pesticide commercialisé à grande échelle dans le milieu du XX^{ème} siècle et qui connut un succès fulgurant, fût le dichlorodiphényltrichloroéthane, plus connu sous le nom de DDT.

¹⁰ Le terme pesticide est dérivé du latin « *pestis* » signifiant « fléau ». Les pesticides sont définis, selon la FAO (*Food and Agriculture Organisation*) et l'OMS (*Organisation Mondiale de la Santé*) comme « *toute substance destinée à prévenir, détruire, attirer, repousser ou lutter contre tout élément nuisible, plante ou insecte, pendant la production, l'entreposage, le transport, la distribution et la transformation de denrées alimentaires, de produits agricoles ou d'aliments pour animaux* ».

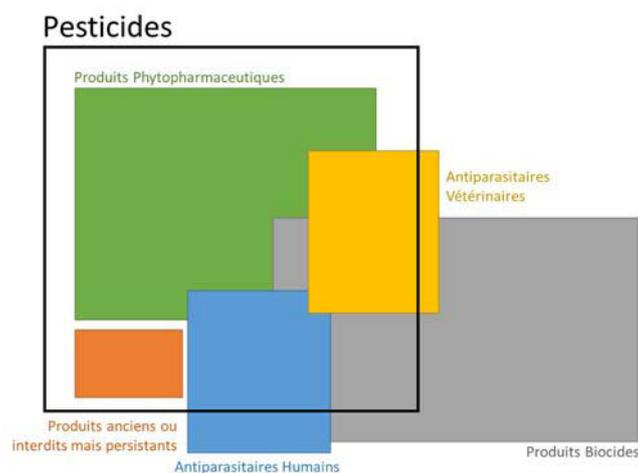


Figure 29. Différents domaines d'utilisation des pesticides. Hors du carré noir se trouvent les antiparasitaires et les biocides n'utilisant pas de molécules pesticides comme principe actif (extrait naturels de plantes, microorganismes, antibiotiques...). Observatoire des Résidus de Pesticides de l'ANSES, www.observatoire-pesticides.gouv.fr.

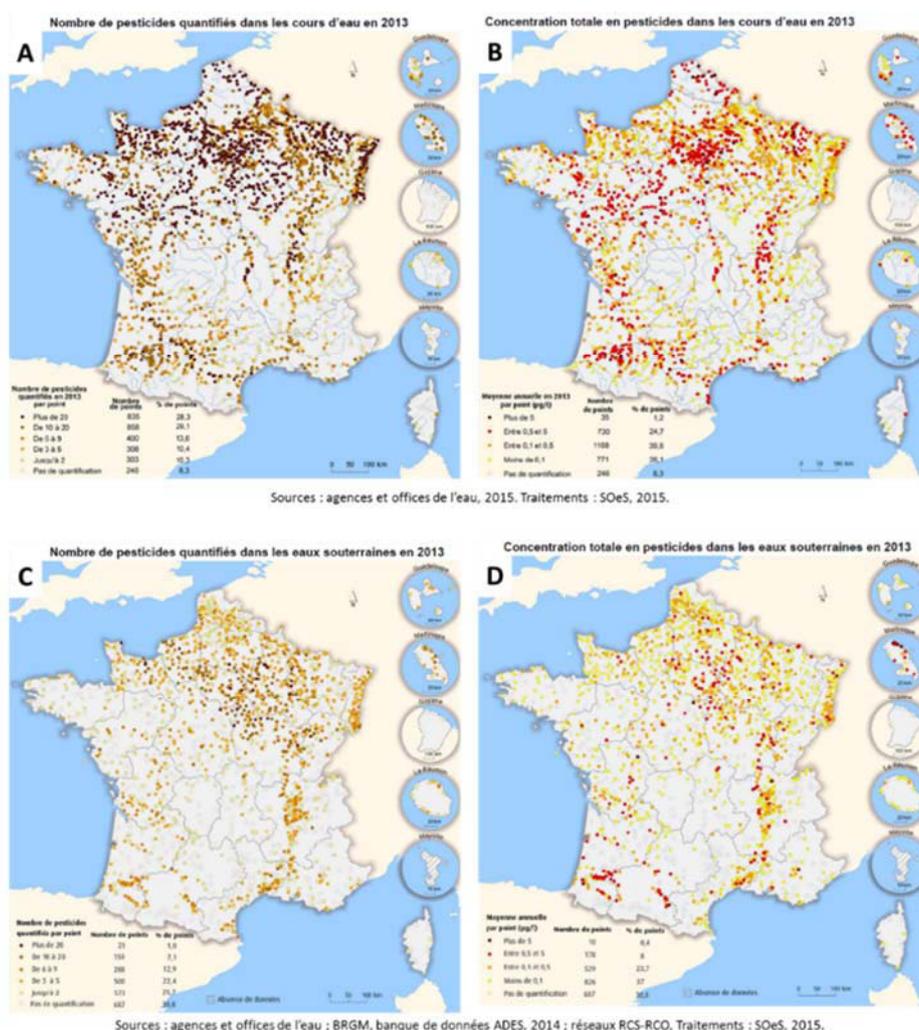


Figure 30. Cartes de contamination des eaux de surfaces et souterraines en France en 2013. La recherche de pesticides (A et C) et leur quantification (B et D) ont été réalisées dans les cours d'eau de surface (A et B) ainsi que dans les eaux souterraines (C et D).

Utilisé pour protéger les populations humaines des parasites et insectes vecteurs de maladies, il contribua fortement à diminuer la présence du typhus et à l'éradication du paludisme en Europe et en Amérique du Nord. Mais au début des années 1960, le doute s'installe quant aux réels bienfaits de cette molécule sur l'environnement et la santé humaine (Carson, 1962), et à partir des années 1970, le DDT fût peu à peu interdit d'utilisation. À l'heure actuelle, il reste cependant le point de référence pour la comparaison de la toxicité des pesticides produits.

Cinq groupes de pesticides existent aujourd'hui : les fongicides (avec lesquels sont regroupés les bactéricides), les herbicides, les insecticides (incluant aussi les acaricides et les nématocides), les molluscicides (limacides et hélicides) et les rodenticides, qui sont respectivement dirigés contre les champignons (ou bactéries), les plantes, les insectes (incluant les acariens et les vers), les mollusques (limaces et escargots) et les rongeurs.

L'immense succès des pesticides en applications agricoles afin d'optimiser la production de denrées alimentaires, a entraîné une étendue rapide de leur utilisation. Mais, en raison de leurs propriétés toxicologiques, leur ubiquité et leur persistance dans l'environnement, leur présence et leur concentration dans la chaîne alimentaire, ils constituent un véritable danger. Ils sont actuellement considérés comme les principaux polluants environnementaux à l'origine de résidus toxiques (molécules mères, produits de dégradation (métabolites), adjuvants) dans les trois compartiments de l'écosystème que sont l'air, l'eau et le sol, mais aussi dans toutes les matrices environnementales (Figure 28). Le secteur agricole, souvent pointé du doigt, n'est pas le seul secteur utilisant des pesticides. En effet, ils sont largement utilisés dans l'industrie ou encore le domaine médical, pour des usages professionnels ou domestiques, bien que le terme « pesticides » soit réservé au secteur agricole (Figure 29), et l'intérêt porté quant à leurs effets secondaires est de plus en plus important.

39

Présents dans l'eau, les pesticides peuvent ruisseler et polluer les eaux de surfaces, et infiltrer le sol en contaminant notamment les nappes phréatiques (Figure 30). Ils peuvent aussi être transportés dans l'atmosphère par l'évaporation et être ensuite retrouvés dans les eaux de pluies.

Les pesticides peuvent également contaminer l'air, suite aux épandages agricoles ou domestiques, ou lors des processus de volatilisation ou d'érosion des sols. Les vents favorisent le transport des aérosols, et peuvent propager les pesticides bien au-delà de leurs zones d'utilisation.

La flore est également exposée à ces molécules toxiques, soit par contact direct suite aux épandages ou *via* l'eau contaminée absorbée par leur système racinaire, soit indirectement lorsque la graine est dite « enrobée ». L'enrobage des semences consiste à débarrasser les graines de leur coque protectrice, et d'appliquer un traitement chimique (à base d'insecticide et/ou de fongicide) ou biologique (en présence de bactéries), afin de créer une couche protectrice artificielle dirigée contre

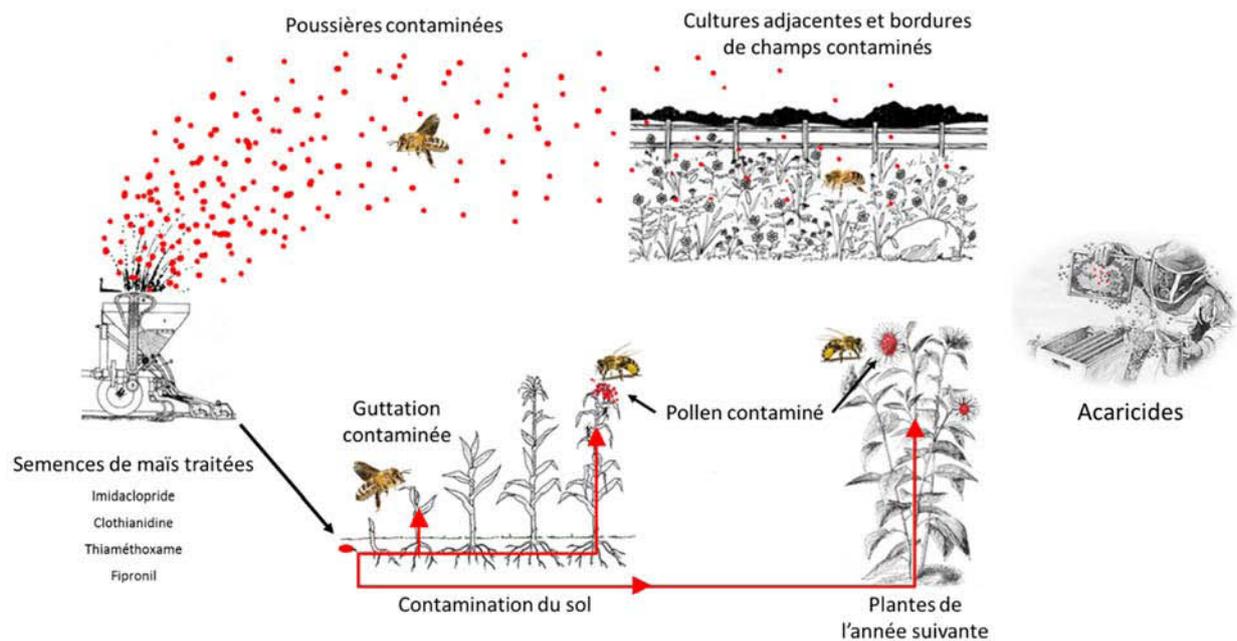


Figure 31. Multiples voies d'exposition des abeilles aux pesticides. Les abeilles sont exposées de manière chronique ou aiguë, par voie orale ou topique, aux pesticides à différents niveaux dans l'environnement (air, eau et plantes). Les butineuses sont les plus exposées car elles rapportent à la ruche ces contaminants qu'elles portent sur elles ou qu'elles transportent dans le pollen, l'eau ou le nectar contaminés (d'après Medrzycki, 2016). De manière indirecte, elles vont ainsi exposer les autres individus de la colonie, et en particulier le couvain *via* le nourrissage de celui-ci avec des produits contaminés. Les abeilles peuvent également être exposées directement dans la ruche, *via* les traitements acaricides par exemple qui sont réalisés par l'apiculteur pour lutter contre les acariens parasites tels que *Varroa destructor*.

les organismes nuisibles. Ceux-ci seront exposés par contact ou de manière systémique, c'est-à-dire que la molécule diffusera à travers toute la plante *via* le système vasculaire au cours de son développement.

2. Les multiples voies d'expositions des abeilles aux pesticides

Les différentes castes de la colonie d'abeilles se retrouvent exposées, directement ou non, aux pesticides déversés dans l'environnement. Cependant, les individus les plus exposés en termes de quantité et de fréquence sont les abeilles butineuses.

Comme cela vient d'être décrit, les pesticides et leurs métabolites peuvent être présents dans l'air, l'eau, le sol, et les plantes, multipliant donc les risques d'exposition des abeilles. Les butineuses peuvent ainsi être en contact avec les molécules toxiques, soit de manière directe lors des épandages de pesticides ou *via* des poussières contaminées au cours de leurs activités de butinage, soit indirectement lorsqu'elles s'exposent à des zones antérieurement contaminées par pulvérisation (*e.g.* en se posant sur les feuilles de plantes traitées), ou à des matrices de la plante contaminées par des pesticides systémiques comme les feuilles ou les fleurs. Sur les plantes, les butineuses peuvent aussi être exposées par voie orale directement au travers des aliments qu'elles récoltent (nectar, pollen, miellat, guttation, rosée et gouttes de pluie déposées), contaminés suite aux traitements par pulvérisations ou systémiques (Figure 31).

40

Les butineuses vont, de ce fait, être indirectement responsables de la contamination des autres individus de la colonie (reine, mâles, ouvrières, couvain) en rapportant l'alimentation souillée à la ruche, ou *via* des échanges trophallaxiques avec les autres membres de la colonie.

L'exposition des abeilles aux pesticides peut être (i) aiguë, suite à une brève disponibilité dans l'environnement, mais souvent à des doses importantes, ou (ii) chronique en provenance de l'extérieur de la ruche où les pesticides sont disponibles sur une longue période dans l'environnement, ou (iii) chroniquement, directement à l'intérieur de la colonie depuis les matrices (miel, pollen, cire) ou congénères contaminés. Il est à noter qu'à ces pesticides rencontrés dans l'environnement, s'ajoutent ceux introduits directement dans la ruche, comme les acaricides, pour lutter contre les acariens parasites tels que *Varroa* sp. ou *Tropilaelaps clareae* (Figure 31). Les abeilles se retrouvent donc constamment exposées à aux molécules mères ou à leurs métabolites (Bonmatin *et al.*, 2015).

Pour limiter l'exposition des abeilles aux pesticides autorisés, il est recommandé de ne faire aucun traitement durant la floraison, en présence de vent ou en période de butinage. Mais cela est-il suffisant pour protéger les abeilles ?

En 2015, la France était le 1^{er} acheteur d'herbicides (30 575 tonnes) et de molluscicides (802 tonnes), le 2nd acheteur d'insecticides/acaricides (2 466 tonnes) après l'Espagne, et le 3^{ème} acheteur de fongicides/bactéricides (27 352 tonnes) derrière l'Italie puis l'Espagne (Eurostat¹¹). Ainsi, plusieurs lois ont été votées ces dernières années, visant à mobiliser le monde agricole pour une réduction de l'utilisation des produits phytosanitaires. Un réseau de fermes pilotes a notamment été créé en 2014, le réseau DEPHY, qui assure le suivi de 946 fermes durant 3 ans par des chercheurs de l'INRA. Ces derniers ont montré que dans la plupart des cas, la réduction de pesticides ne diminuerait pas, voire même améliorerait, la productivité (dans 94% des cas) et la rentabilité (dans 77% des cas) de l'exploitation. L'extrapolation à l'ensemble du réseau national pourrait ainsi permettre une réduction de près de 30% des pesticides (Lechenet *et al.*, 2017). La même année, la loi Labbé a interdit la vente aux particuliers de produits phytopharmaceutiques ainsi que leur utilisation sur les voiries, dans les espaces verts et forêts publiques. De plus, certaines dérogations accordées jusque-là pour les épandages aériens ont été supprimées.

Enfin, le « Plan Ecophyto II » instauré en 2015 vise notamment à réduire de 50% en dix ans l'utilisation des pesticides avec un premier palier de 25% en 2020 *via* des recommandations auprès des utilisateurs professionnels, particuliers et des collectivités. Il a permis d'établir des réseaux de surveillances de la contamination des différents compartiments environnementaux. Ces mesures devraient permettre d'évaluer les risques potentiels pour la population, les animaux d'élevage, dont l'abeille domestique, ainsi que sur la faune sauvage (Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt & Ministère de l'Ecologie du Développement durable et de l'Energie, 2016).

41

3. Cas du fipronil, un insecticide de la famille des phénylpyrazoles

Le fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluorométhyl)phényl]-4-[(trifluorométhyl)sulfinyl]-1H-pyrazole), de formule brute $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$, est un insecticide de la famille des phénylpyrazolés. La première synthèse de phénylpyrazole a eu lieu en 1979, tandis que celle du fipronil a été mise au point par la société française Rhône-Poulenc en 1987. Introduit sur le marché en 1994 (Afssa & Afsse, 2005), il fut successivement la propriété du groupe français Aventis, puis de Bayer et enfin de BASF, deux sociétés allemandes. Depuis le milieu des années 1990, le fipronil est largement utilisé dans différents domaines, pour des usages domestiques et/ou professionnels.

¹¹ Ces données sont issues du site Eurostat, office de statistique de l'Union européenne (ec.europa.eu/eurostat/fr/home), consulté le 22 août 2017. Ces données regroupent l'ensemble des groupes de pesticides énoncés précédemment, sans prendre en compte les rodenticides. De plus, elles ne considèrent pas l'utilisation avérée de la molécule.

Il est en effet présent dans les produits commerciaux permettant de lutter contre des ectoparasites des animaux de compagnies comme les puces et les tiques (Frontline[®], Fiprosport[®], Fiprokil[®]...) et ceux du bétail, mais également contre les fourmis (Fourmidor[®]), les blattes (Goliath[®]) ou les termites (Termidor[®]). Il est également employé en agrochimie dans la lutte contre certains ravageurs tels que les sauterelles, les criquets ou encore les larves de taupins (insectes coléoptères). Commercialisé notamment sous le nom de Regent[®] en agriculture, le fipronil est disponible sous plusieurs formes, en granulés, en solution ou en enrobage de semences, et utilisé dans le traitement des cultures fruitières, céréalières, maraichères et même horticoles. Le mode d'application et l'exploitation de ses propriétés systémiques dépendent du type de ravageurs visés mais aussi de la plante à protéger.

En France, le Regent[®] s'est vu interdit d'utilisation en 2004 sur les semences de maïs et de tournesol. En fin d'année 2013, l'Union européenne a voté l'interdiction temporaire d'utilisation des cultures en plein air pour deux ans, et définitive pour certaines cultures sous serres (excepté les poireaux, les oignons et les brassicacées comme les choux ou les radis). De septembre 2015 à janvier 2016, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA pour *European Food Safety Authority*) a lancé un appel à la collecte de données afin de réévaluer les risques de l'utilisation de ce produit. Alors que la Commission européenne devait décider fin 2016 des suites à donner quant à l'utilisation du fipronil ainsi que celle d'autres molécules, celle-ci a décidé de maintenir le moratoire jusqu'à l'automne 2017, le temps pour l'EFSA de finaliser la réévaluation complète des risques. Il semblerait toutefois que le fipronil soit tout simplement abandonné en Europe, BASF ne souhaitant pas investir dans des études coûteuses nécessaires à la ré-homologation de la molécule en agriculture¹².

Cet été, le fipronil a fortement fait de parler de lui en Europe au travers du « scandale des œufs contaminés ». Ce scandale alimentaire a débuté en Belgique où l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA), l'agence sanitaire belge, alerte la Commission européenne que des traitements à base de fipronil ont été utilisés sur des animaux destinés à la consommation humaine malgré l'interdiction. Ces traitements ont été utilisés lors de la désinfection de plusieurs exploitations agricoles belges, allemandes et néerlandaises, par des entreprises spécialisées, dans le but de traiter celles-ci contre le pou rouge des poules, un acarien parasite hématophage provoquant une inflammation et infection de la peau et pouvant être vecteur de virus. Tandis que la viande de poulet ne semble pas concernée par le retrait du commerce, des millions d'œufs de poules sont retirés dans 17 pays européens, dont la France, mais aussi plusieurs pays asiatiques. Outre les œufs, une trentaine de produits sont retirés en France, dont la liste a été diffusée le 24 août dernier par le Ministère de

¹² Informations publiées dans l'article du journal Le Monde le 12 Janvier 2017.
http://www.lemonde.fr/planete/article/2017/01/12/2017-annee-decisive-pour-les-insecticides-tueurs-d-abeilles_5061281_3244.html

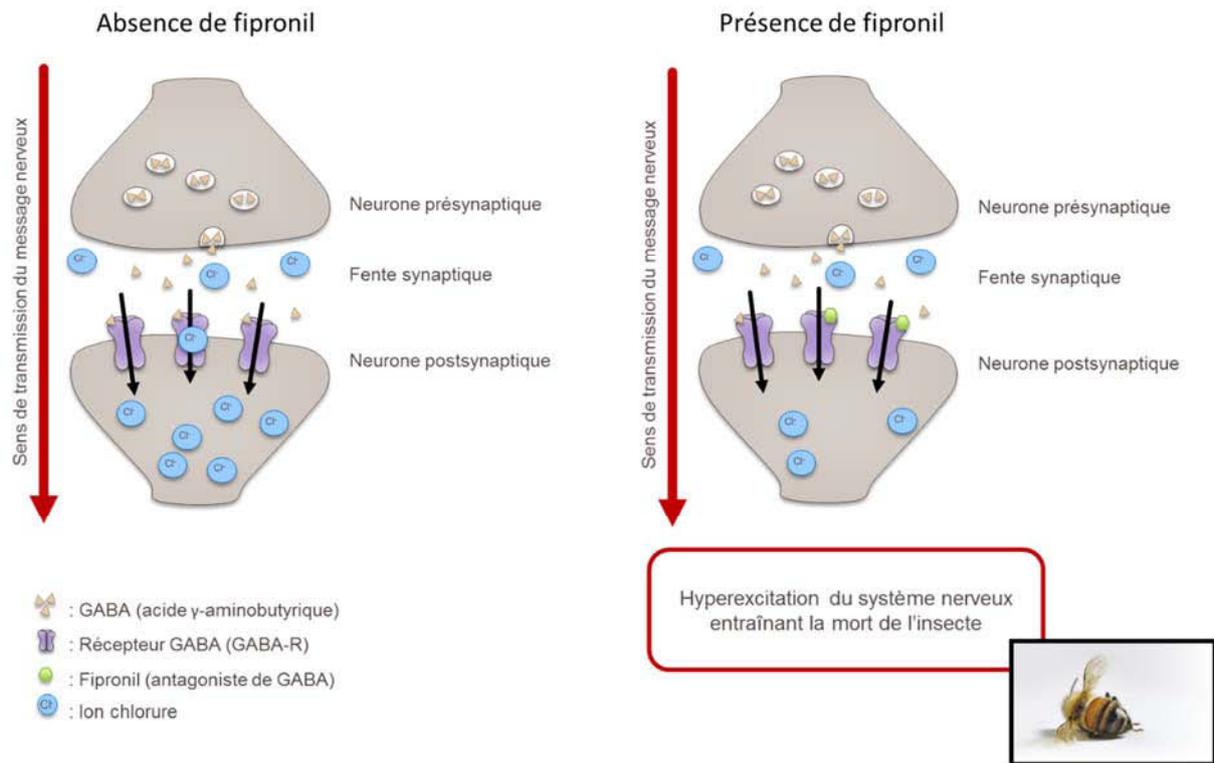


Figure 32. Mode d'action du fipronil sur les récepteurs GABA. L'acide γ-aminobutyrique (GABA) est un neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. En activant son récepteur (GABA-R), il entraîne une entrée massive d'ions chlorure à l'intérieur du neurone postsynaptique, permettant une dépolarisation du neurone et la transmission du signal nerveux. En présence de fipronil, antagoniste non-compétitif du GABA, le fonctionnement du GABA-R est ralenti, diminuant l'entrée d'ions chlorure Cl⁻ dans le neurone. La diminution de la dépolarisation entraîne à terme une hyperexcitabilité du neurone provoquant la mort de l'insecte.

l'Agriculture et de l'Alimentation. Ces produits, bien que considérés comme « ne présentant pas de risque pour la santé », contenaient en effet du fipronil en concentration supérieure à la LMR, fixée à 0,005 mg de fipronil par kg de produit.

3.1. Mode d'action et toxicité

Comme la plupart des insecticides, le fipronil agit au niveau du système nerveux central (SNC) des insectes mais également au niveau du système nerveux intestinal. C'est un antagoniste non-compétitif de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC chez les mammifères et les oiseaux. Les insectes ayant un système circulatoire ouvert, le GABA est par conséquent présent dans tout l'organisme. Le GABA a pour fonction, dans des conditions physiologiques normales, de permettre une entrée rapide des ions chlorures dans le neurone postsynaptique en se fixant sur les récepteurs membranaires GABA (GABA-R) des canaux chlorures des cellules nerveuses (Figure 32). L'entrée des ions entraîne une dépolarisation de la membrane des neurones, abaissant leur activité électrique et permettant ainsi la transmission du signal neuronal (Vidau, 2009; Casida & Durkin, 2012).

Le fipronil, comme tous les phénylpyrazolés, a pour cibles primaires les GABA-R, et plus précisément les récepteurs ionotropes GABA_A et GABA_C. L'insecticide se fixe sur un site du GABA-R différent de celui du GABA, limitant la fixation des neurotransmetteurs (Figure 32). L'ouverture des canaux ainsi inhibée diminue l'entrée d'ions dans le neurone postsynaptique, limitant la dépolarisation des cellules nerveuses et entraînant par conséquent une hyperpolarisation de celles-ci. À terme, des tremblements et des convulsions apparaissent, pouvant aller jusqu'à provoquer la mort de l'organisme (Vidau, 2009; Casida & Durkin, 2012).

L'affinité du fipronil pour les GABA-R des invertébrés est bien supérieure à celle pour ceux des mammifères chez qui davantage d'ions chlorures parviennent à passer les canaux (Hainzl *et al.*, 1998). De plus, le fipronil possède également une forte affinité pour les récepteurs neuronaux ionotropes au glutamate GluCl-R (Narahashi *et al.*, 2009). Ces canaux chlorures sont activés par le glutamate. Ils sont exprimés chez les invertébrés dont les insectes et absents chez les mammifères, et leur activité semble fortement inhibée en présence de fipronil. Bien que GABA et GluCl génèrent tous deux un courant d'ions chlorure à l'intérieur des neurones, leurs récepteurs spécifiques fonctionnent indépendamment, et l'inhibition de l'un n'est pas corrélée à celle de l'autre (Narahashi *et al.*, 2009).

Ainsi, du fait de son affinité pour ces deux familles de récepteurs qui lui confère une toxicité sélective très intéressante et très efficace contre les insectes considérés comme nuisibles, le fipronil n'épargne malheureusement pas les organismes non cibles tels que les vers de terre, les invertébrés aquatiques ou bien les insectes pollinisateurs comme les papillons, les bourdons ou les abeilles (Pisa

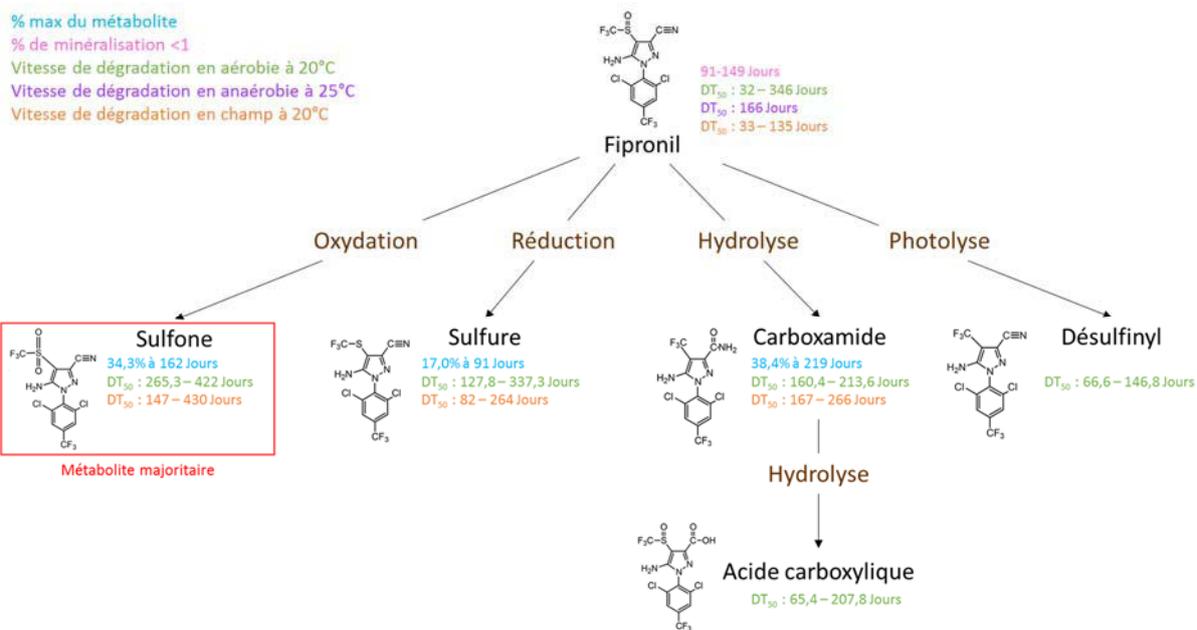


Figure 33. Dégradation du fipronil dans le sol et de ses principaux métabolites. La DT₅₀ est la durée nécessaire à la dégradation (au laboratoire) ou à la dissipation (au champ) de 50% de la quantité initiale de substance active présente dans le sol. Elle est calculée à partir des concentrations mesurées au cours du temps dans un sol donné. Au champ, la dissipation comprend les différents processus de dégradation, mais aussi, parfois, la volatilisation ou le transfert de la substance à travers le sol. Synthèse réalisée à partir des données de l'AGRITOX et de Connelly *et al.*, 2011.

et al., 2015). En outre, à des doses plus élevées que celles retrouvées chez les invertébrés, le fipronil peut entraîner des effets néfastes chez les vertébrés tels que les mammifères, les oiseaux, les poissons ou les amphibiens. Les organismes présentent alors des symptômes d'intoxication de type retard de croissance et de développement, diminution de la reproduction, ou encore, atteinte des systèmes immunitaires (Gibbons *et al.*, 2015).

3.2. Dégradation du fipronil

3.2.1. Devenir du fipronil dans l'environnement

Une fois dans l'environnement, le fipronil est dégradé principalement dans les compartiments eau et sol. En effet, la molécule subit une étape d'oxydation et de réduction dans le sol, mais peut également, tout comme dans l'eau, subir des étapes d'hydrolyse et de photolyse (Connelly, 2001). Selon l'ANSES et sa base de données AGRITOX¹³, 91 à 149 jours sont nécessaires pour que le pourcentage de fipronil minéralisé dans le sol soit inférieur à 1% (Figure 33). La vitesse de dégradation et la formation de métabolites dépendent toutefois du type de sol et des conditions d'oxygénation du milieu.

Le fipronil peut être transformé en 3 principaux métabolites (dégradation biologique) : (i) le fipronil-sulfone, métabolite majoritaire dans le sol, qui est essentiellement formé par oxydation du fipronil près de la surface du sol, (ii) le fipronil-sulfure principalement formé après réduction, et (iii) le fipronil-carboxamide qui apparaît après hydrolyse à la fois dans le sol et dans l'eau. Le fipronil-desulfinyl est quant à lui, issu de la photolyse (dégradation physico-chimique) du fipronil (Figure 33). Le fipronil peut également être dégradé par les micro-organismes présents dans les eaux et les premières couches du sol pour former le fipronil-sulfone par oxydation, ainsi que le fipronil-sulfure par réduction de la molécule mère.

44

3.2.2. Métabolisation du fipronil chez l'abeille

Chez l'abeille, la détoxification se déroule principalement dans le corps gras, assurant la détoxification des xénobiotiques pénétrant au travers de la cuticule, et dans l'intestin, permettant l'élimination des xénobiotiques ingérés. Le but de la détoxification est de transformer les substances liposolubles en molécules hydrosolubles devenues excrétables, afin de favoriser leur évacuation vers l'extérieur de l'organisme. Ce processus est assuré par deux systèmes enzymatiques à l'intérieur des cellules : les enzymes de phase I, principales actrices de la transformation des xénobiotiques, et les enzymes de phase II.

¹³ <http://www.agritox.anses.fr/>

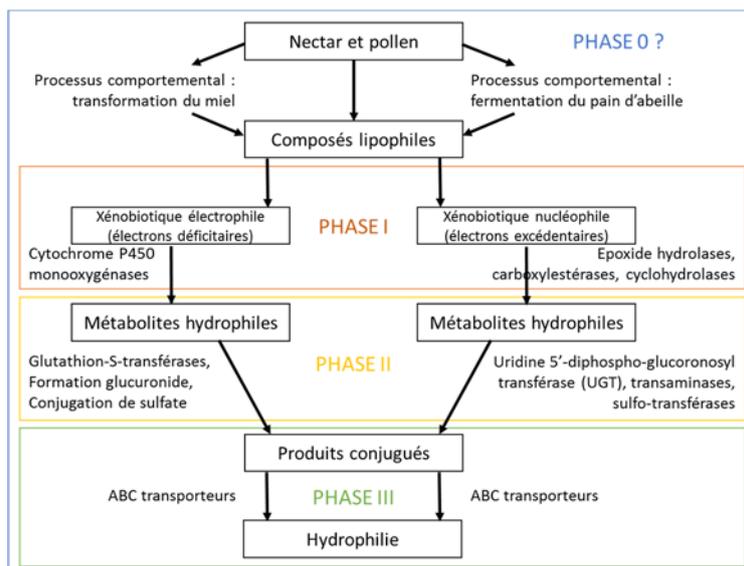


Figure 34. Schéma du processus de détoxification chez l'abeille *Apis mellifera*. L'existence d'un comportement social de détoxification dans les colonies, comparable au comportement d'immunité sociale, n'a pas encore été clairement étudiée. Toutefois, les comportements naturellement exécutés par les abeilles tels que la récolte de nectar et de pollen sur différentes plantes permettent la dilution des toxiques. De plus, la fermentation du pain d'abeilles peut engendrer la dégradation des molécules toxiques par les champignons et bactéries. Enfin, la transformation du nectar en miel grâce aux enzymes digestives peut altérer les molécules. L'effet de ces comportements sur une première phase d'élimination ou de réduction des concentrations des toxiques dans la ruche avant leur consommation est noté «Phase 0» sur ce schéma (d'après Berenbaum and Johnson, 2015).

Tableau 4. Toxicité de différents pesticides sur l'abeille, comparée au DDT. La dose utilisée est donnée en gramme par hectare, la dose létale médiane (DL₅₀) en nanogramme par abeille à 48h suite à une administration par voie orale. La dernière colonne exprime la toxicité par rapport au DDT (d'après Pisa *et al.*, 2015, mis à jour d'après les données de l'AGRITOX). Ainsi, le fipronil serait 6 429 fois plus toxique que le DDT.

Pesticide	Famille	Exemple	Principale utilisation	Dose	DL ₅₀ aiguë par contact en 48h (ng/ab)	DL ₅₀ aiguë orale en 48h (ng/ab)	HQ (g/ha; µg/ab)	Ratio dose orale DDT/DL ₅₀
Boscalide	Carboxamide	Cantus®	Fongicide	-	200 000	166 000	-	0,2
Glyphosate	Amino-phosphonate	Roundup®	Herbicide	-	100 000	100 000	-	0,3
DDT	Organochloré	Dinocide®	Insecticide	200-600	-	27 000	22	1
Thiaclopride	Néonicotinoïde	Proteus®	Insecticide	62,5	38 820	17 320	4	1,6
Acétamipride	Organochloré	Supreme®	Insecticide	30 à 150	8 090	14 530	-	1,9
<i>Tau</i> -fluvalinate	Pyréthroïde	Apistan®	Acaricide	-	12 000	12 600	-	2,1
Amitraze	Formamidine	Apivar®	Acaricide	-	-	12 000	-	2,3
Coumaphos	Organophosphoré	Perizin®	Acaricide	-	-	3 000	-	9,0
Methiocarb	Carbamate	Merusol®	Insecticide	150 à 2 200	230	470	9 565	57
Carbofuran	Carbamate	Curater®	Insecticide	600	-	160	3 750	169
Deltaméthrine	Pyréthroïde	Décis®	Insecticide	7,5	1,5	79	3 000	342
λ-cyhalothrine	Pyréthroïde	Karate®	Insecticide	150	-	38	3 947	711
Thiamétoxame	Néonicotinoïde	Cruiser®	Insecticide	69	24	5	13 800	5 400
Fipronil	Phénylpyrazole	Regent®	Insecticide	50	5,9	4,2	11 990	6 429
Clothianidine	Néonicotinoïde	Poncho®	Insecticide	50	44,3	3,8	12 500	7 105
Imidaclopride	Néonicotinoïde	Gaucho®	Insecticide	75	81	3,7	20 270	7 297

Les enzymes de phase I, les cytochromes P-450 (ou CYP450) et les carboxylestérases (CCE), sont des enzymes de fonctionnalisation. Les premières vont modifier les molécules en y ajoutant des groupements, tandis que les secondes coupent des liaisons ester. Le but est de favoriser l'hydrophilie des molécules, ou permettre aux enzymes de phase II d'y greffer une molécule très hydrophile. Les CYP450 sont localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule et catalysent en présence d'oxygène et de coenzymes des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Les enzymes de phase II, localisées dans le cytosol, catalysent quant à elles, des réactions de conjugaison entre les xénobiotiques et des molécules endogènes très hydrophiles comme le glutathion *via* la Glutathion-S-transférase (GST) ou le glucose *via* l'UDP-glucuronyl-transférase (UDP-GT) (Figure 34) (Berenbaum & Johnson, 2015).

Les abeilles possèdent moins de gènes codant pour des enzymes de détoxification que la plupart des arthropodes comme la drosophile, le bombyx du mûrier ou l'anophèle. Leur génome montre cependant la présence de 46 gènes codant pour des CYP450, environ 80 pour des CCE, une dizaine pour les GST et autant pour les UDP-GT (Claudianos *et al.*, 2006; Wu & Hoy, 2016).

Chez les abeilles, suite à la détoxification du fipronil, plusieurs métabolites sont formés tels que le fipronil sulfone (Chauzat *et al.*, 2009; Kasiotis *et al.*, 2014). La toxicité supérieure des métabolites, et en particulier celle du fipronil sulfone, comparativement à la molécule mère ayant déjà été observée en culture cellulaire (Romero *et al.*, 2016), la formation de ces molécules lors de la dégradation du fipronil pourrait jouer probablement un rôle non négligeable dans la toxicité induite chez l'abeille.

45

4. Effets du fipronil sur les abeilles

L'évaluation de la toxicité des produits phytosanitaires sur les abeilles nécessite de mesurer notamment la Dose Létale médiane (DL₅₀), c'est-à-dire la dose unique de substance active causant la mort de 50% des individus de la population étudiée. La DL₅₀, qui est généralement réalisée sur une durée de 48h, permet d'évaluer la toxicité aiguë de la molécule sur des abeilles ouvrières exposées par voie orale ou topique. La toxicité du fipronil et de ses métabolites ont donc été étudiées chez *Apis mellifera* en toxicité aiguë. Ainsi, 48h après administration de différentes doses de fipronil, la DL₅₀ a été déterminée à 5,93 ng/abeille suite à une exposition par voie topique et à 4,17 ng/abeille après une exposition par voie orale (Données de l'AGRITOX). La valeur de la DL₅₀ du fipronil, tout comme celles des insecticides néonicotinoïdes, est relativement faible comparée à celle des anciennes classes d'insecticides telles que les organophosphorés, les pyréthriinoïdes ou les carbamates (Decourtye & Devillers, 2010; Pisa *et al.*, 2015) (Tableau 4). Cette caractéristique souligne donc la forte toxicité de cette nouvelle génération de molécules à activité systémique, notamment vis-à-vis des abeilles et des pollinisateurs de manière générale. Il est toutefois à noter que la détermination des DL₅₀ ne prend pas

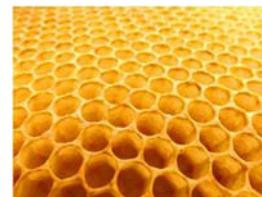
Tableau 5. Fréquence de détection du fipronil et de deux de ses métabolites, et concentrations moyennes retrouvées dans les différentes matrices de la ruche.
(complété d'après Aufauvre, 2013)



Pollen



Miel



Cire



Abeille

Molécule	Références	Pollen		Miel		Cire		Abeille	
		Echantillons positifs (%)	Concentration moyenne (µg/kg)						
Fipronil	Chauzat <i>et al.</i> , 2006	12,4 (n=81)	1,2						
	Mullin <i>et al.</i> , 2010	0,3 (n=350)	28,5			1,4 (n=208)	12,8	1,4 (n=140)	1 535
	Bernal <i>et al.</i> , 2010	3,7 (n=845)	2						
	Chauzat <i>et al.</i> , 2009	12,4 (n=185)	1,2					9,1 (n=187)	0,5
	Pareja <i>et al.</i> , 2011			6,5 (n=31)	70			NP	160
	Kiljanek <i>et al.</i> , 2016							NP (n=17)	83,1
Sulfone	Chauzat <i>et al.</i> , 2006	3,7 (n=81)	1,2						
	Chauzat <i>et al.</i> , 2009	12,4 (n=185)	1,7					9,1 (n=187)	0,4
Désulfinyl	Chauzat <i>et al.</i> , 2006	11,1 (n=81)	1,3						
	Chauzat <i>et al.</i> , 2009	12,4 (n=185)	1					9,1 (n=187)	1,2

en compte différents facteurs qui pourraient moduler les valeurs obtenues tels que l'âge ou la sous-espèce des abeilles exposées (Decourtye & Devillers, 2010), mais aussi les conditions expérimentales pour déterminer la valeur de la DL_{50} comme la température, le mode d'exposition ou bien une exposition antérieure des abeilles à d'autres molécules (Pisa *et al.*, 2015). Henry et collaborateurs ont quant à eux montré l'importance du contexte environnemental sur les effets des pesticides (Henry *et al.*, 2014). De plus, si ces études de toxicité aiguë représentent des données essentielles pour la santé de l'abeille, elles n'en restent pas moins éloignées du principal mode d'exposition des colonies aux pesticides, c'est-à-dire des expositions chroniques, et il n'existe pas encore de protocoles normalisés pour la mesure des effets létaux ou sublétaux.

En effet, le fipronil et ses métabolites, comme beaucoup de polluants, se retrouvent dans les différentes matrices de la ruche (Tableau 5), exposant les abeilles de manière chronique à de faibles doses, par voie topique et/ou orale, et engendrant progressivement des effets néfastes sur et les individus exposés, mais aussi potentiellement sur la colonie entière. Aussi, les études menées (i) en laboratoire sur des abeilles en cagettes exposées à de faibles doses administrées chroniquement, (ii) sur des colonies entières maintenues en environnement contrôlé sous tunnel, ainsi que (iii) en plein champ, permettent de mieux rendre compte de l'impact des différents contaminants sur la santé de l'abeille. De plus, la majorité des études se focalise sur le stade adulte, alors que les pesticides peuvent également affecter le développement de l'insecte, notamment au stade larvaire (Zaluski *et al.*, 2015).

46

4.1. Effets à l'échelle individuelle et sur la colonie

Comme dans le cas d'une infection par *Nosema*, l'exposition au fipronil peut entraîner des effets à l'échelle individuelle mais aussi au niveau de l'organisation de la colonie.

4.1.1. Effet du fipronil en faible dose sur la mortalité

Les effets du fipronil utilisé à une faibles concentration sur la mortalité des abeilles varient selon les doses administrées, les solvants utilisés, mais aussi selon le mode d'exposition (topique ou oral), ainsi que de sa fréquence et sa durée.

Aliouane et collaborateurs ont comparé une exposition des abeilles à deux doses de fipronil (0,1 et 0,01 ng par abeille) et *via* les deux modes d'exposition, topique et oral, en exposition chronique. Leurs résultats montraient que la plus faible dose n'entraînait aucune différence de mortalité avec les abeilles non intoxiquées, indépendamment du mode d'exposition. En revanche, à 0.1 ng de fipronil, 100% des abeilles décédaient après 7 jours d'exposition par voie orale contre 80% par voie topique (Aliouane *et al.*, 2009). De la même manière, Decourtye et collaborateurs ont obtenu 100% de

mortalité des abeilles après 5 jours d'exposition orale au fipronil à 0,06 et 0,3 ng par abeille (Decourtye *et al.*, 2011).

Ces résultats semblent assez surprenants comparativement à d'autres études où le fipronil, utilisé en plus forte concentration (1 µg/L), présentait des mortalités moindres en exposition orale chronique. En effet, ces études ont montré que la mortalité des abeilles exposées était de 12 à 35% contre 9 à 20% chez les abeilles non intoxiquées (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014).

A contrario, l'étude de Renzi et collaborateurs n'a montré aucune différence de mortalité lorsque les abeilles étaient exposées à 1 µg/L de fipronil (Renzi *et al.*, 2016). Cependant, dans cette étude les abeilles étaient exposées seulement les 10 premiers jours de l'expérimentation, contrairement aux autres études où le fipronil était administré tout au long de l'expérimentation, sans interruption.

4.1.2. Effet du fipronil sur les activités de butinage : atteintes des processus d'apprentissage, de mémorisation et de locomotion

De manière intrinsèque, les difficultés d'apprentissage et de mémorisation des individus engendrent des problèmes d'organisation à l'échelle sociale, et ces comportements sociaux peuvent être perturbés par la présence de molécules chimiques qui interagissent avec les récepteurs neuronaux, les canaux ioniques, les voies de signalisation cellulaires ou encore entraînent des modifications des métabolismes neuronaux (Belzunces *et al.*, 2012). Les récepteurs GABA des insectes sont majoritairement exprimés dans les aires cérébrales qui correspondent aux sens olfactifs, visuels, à l'apprentissage et la mémorisation.

Plusieurs études utilisant le test du REP (réflexe d'extension du proboscis) où les abeilles ont été exposées à de faibles doses de fipronil (0,01 ng/abeille à 0,5 ng/abeille) par voie orale (correspondant à environ 1/420^{ème} et 1/8^{ème} de la DL₅₀ à 48h) ou topique (soit 1/590^{ème} et 1/12^{ème} de la DL₅₀ à 48h) ont montré dans l'ensemble une perturbation plus importante des comportements d'apprentissage que des processus de mémorisation, avec une diminution de la capacité de discrimination des odeurs (généralisation) (Decourtye *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009; Bernadou *et al.*, 2009). Du fait de l'atteinte nerveuse induite par les pesticides, il n'est pas rare d'observer des abeilles tremblantes après une exposition à des doses aiguës de toxique. Qu'en est-il du fipronil à de faibles doses ?

Aliouane et collaborateurs ont enregistré une diminution de l'activité locomotrice des abeilles exposées chroniquement à une très faible dose de toxique (0,01 ng/abeille) bien que ce ne soit pas significativement différent des abeilles non exposées. En effet, les abeilles intoxiquées semblaient moins actives, et effectuaient des trajets moins longs que les abeilles témoins. Elles semblaient également rester davantage au fond des cagettes de contention (30 x 30 x 4 cm) avec une diminution

du nombre de déplacements verticaux. À ces faibles doses, les chercheurs n'avaient pas noté d'abeilles tremblantes ou présentant des mouvements anormaux des ailes, des pattes ou du corps entiers

Ainsi, les perturbations de l'apprentissage ainsi qu'une diminution des capacités de déplacement, auxquelles s'ajoutent une diminution significative du nombre de butineuses actives dans les colonies intoxiquées (Colin *et al.*, 2004), laissent supposer une perturbation importante de l'activité de butinage lorsque les abeilles sont exposées à de faibles doses de fipronil engendrant probablement des conséquences sur l'ensemble de la colonie.

4.1.3. Effet du fipronil sur la reproduction

Des études récentes montrent que le fipronil présente un effet néfaste sur la reproduction des abeilles puisque la contamination des mâles entraîne une diminution de la quantité et la viabilité des spermatozoïdes (Kairo *et al.*, 2016, 2017). En outre, l'insémination de reines non exposées à cette molécule avec des spermatozoïdes de mâles intoxiqués montre également une diminution de la quantité et de la viabilité de ces cellules une fois stockées à l'intérieur de la spermathèque des reines (Kairo *et al.*, 2016).

De plus, dans une étude menée par Zaluski et collaborateurs, les colonies d'*A. mellifera* exposées à des doses sublétales de fipronil (8 µg/L) semblaient affectées dans leur développement. En effet, elles présentaient une diminution significative de 34% d'œufs éclos en 4 semaines comparativement aux colonies non exposées où 92% des œufs avaient éclos. À 8 semaines post-exposition, aucun œuf n'avait éclos. De la même façon, tandis que le nombre de pupes se maintenait à environ 87% pour une colonie non intoxiquée, les colonies exposées au fipronil présentaient seulement 28% de larves au stade nymphal (Zaluski *et al.*, 2015).

4.1.4. Effet du fipronil sur l'immunité

De la même façon que lors d'une infection par *N. ceranae*, l'exposition au fipronil entraîne une diminution de l'expression de gènes codant pour des peptides antimicrobiens (PAM) comme l'hyménoptaécine (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012) ou la défensine 1 (Zaluski *et al.*, 2015), molécules impliquées dans la défense des cellules contre les microorganismes pathogènes. De plus, une diminution de l'expression des gènes codant pour le lysozyme 1, enzyme de l'immunité innée hydrolysant les peptidoglycanes de la paroi des bactéries Gram positives, ainsi que pour une glucose-méthanol-choline oxydoréductase (ou GMC) a été constatée chez les abeilles exposées au fipronil (Aufauvre *et al.*, 2014). Ainsi si l'immunité des abeilles est affectée suite à une exposition au fipronil, il est possible qu'elles soient plus sensibles aux agents pathogènes.

Tableau 6. Modulations physiologiques induite par le fipronil chez *Apis mellifera*. Ce tableau résume les mesures des activités enzymatiques chez l'abeille ouvrière et faux-bourdon suite à une exposition au fipronil.

Marqueur	Acronyme	Fonction physiologique	Activité en présence de fipronil
Acétylcholinestérase	AChE	Enzyme hydrolysant le neurotransmetteur acétylcholine pour permettre au neurone de revenir à son état de repos après activation	Diminution chez les mâles (Kairo <i>et al.</i> , 2017) Pas de modification chez les ouvrières (Carvalho <i>et al.</i> , 2013 ; Roat <i>et al.</i> , 2017)
Carboxylestérase	CaE	Enzyme impliquée dans le contrôle endocrinien et le processus de détoxification (enzyme de phase I)	Pas de modification chez les mâles (Kairo <i>et al.</i> , 2017) Augmentation des 3 isoformes chez les ouvrières (Roat <i>et al.</i> , 2017) Augmentation de CaE-1, diminution de CaE-2 et 3 chez les ouvrières (Carvalho <i>et al.</i> , 2013)
Catalase	CAT	Enzyme antioxydante	Augmentation chez les ouvrières (Carvalho <i>et al.</i> , 2013) Augmentation chez les mâles (Kairo <i>et al.</i> , 2017)
Glutathion-S-Transférase	GST	Enzyme antioxydante, impliquée dans la détoxification des xénobiotiques	Pas de modification chez les mâles (Kairo <i>et al.</i> , 2017) Pas de modification dans l'intestin des ouvrières (Carvalho <i>et al.</i> , 2013 ; Renzi <i>et al.</i> , 2016 ; Roat <i>et al.</i> , 2017) Augmentation dans la tête des ouvrières (Renzi <i>et al.</i> , 2016)
Phosphatase alcaline	ALP	Déphosphorylation de métabolite	Diminution chez les ouvrières (Carvalho <i>et al.</i> , 2013) Pas de modification chez les mâles (Kairo <i>et al.</i> , 2017)

4.2. Effet de la co-exposition Fipronil-Nosema

Dans l'environnement, les colonies sont confrontées et exposées à différents éléments, d'origines naturelle ou anthropique, qui peuvent avoir un impact négatif sur leur santé. En outre, c'est souvent l'action combinée d'un ensemble de facteurs qui accélère le déclin de la colonie.

Plusieurs études ont démontré des effets additionnels voir synergiques lorsque des abeilles sont à la fois exposées au fipronil et infectées par *N. ceranae*. En effet, une synergie de la mortalité des abeilles a été observée dans les études de Vidau *et al.*, 2011a, et Aufauvre *et al.*, 2012. De plus, la dernière étude montrait que les mêmes effets étaient observés, quels que soient l'ordre d'exposition aux deux facteurs (infection et intoxication).

Kairo et collaborateurs ont montré que l'effet de la co-exposition *N. ceranae*/fipronil sur différentes marqueurs physiologiques des mâles (marqueurs du métabolisme énergétique, des systèmes immunitaire, de détoxification et antioxydant) étaient davantage augmentés que lorsque les faux-bourçons étaient uniquement infectés ou intoxiqués (Kairo *et al.*, 2017).

Chez les abeilles ouvrières, l'expression des gènes codant pour les systèmes immunitaires et le métabolisme des sucres semblent au contraire diminuer plus fortement dans le cadre d'une co-exposition (Aufauvre *et al.*, 2014).

Ainsi, selon ces études, la co-exposition à ces deux facteurs de stress pour l'abeille semble aggraver les effets observés en présence de l'un ou l'autre de ces facteurs pris indépendamment. Cela appuie l'hypothèse d'une origine multifactorielle de la dégradation de l'état de santé des colonies d'abeilles.

49

5. Modulations physiologiques chez l'abeille induite par le fipronil

Des études ont également été menées sur abeilles, concernant l'impact du fipronil sur les systèmes antioxydants de l'abeille, dont l'ensemble des résultats de ces études sont reportés plus en détail dans le [Tableau 6](#).

En pulvérisation de fipronil à des doses correspondant à $1/10^{\text{ème}}$ et $1/20^{\text{ème}}$ de la DL_{50} , une modulation de l'activité de plusieurs enzymes des systèmes de détoxification et antioxydants dans les intestins d'abeilles a été constatée (Carvalho *et al.*, 2013). De même, une récente étude a été menée sur des abeilles traitées avec une faible dose de 0,01 ng de fipronil (soit $1/417^{\text{ème}}$ de la DL_{50}). Ils ont notamment montré que lorsque les abeilles aient cessé d'être exposées au fipronil, les perturbations induites chez les abeilles n'étaient pas rétablies, suggérant que les effets du fipronil sur la modulation de l'activité de cette enzyme soient irréversibles (Roat *et al.*, 2017). Enfin, Kairo et collaborateurs ont également évalué la modulation de ces marqueurs en présence de fipronil chez les faux-bourçons exposés (Kairo *et al.*, 2017).

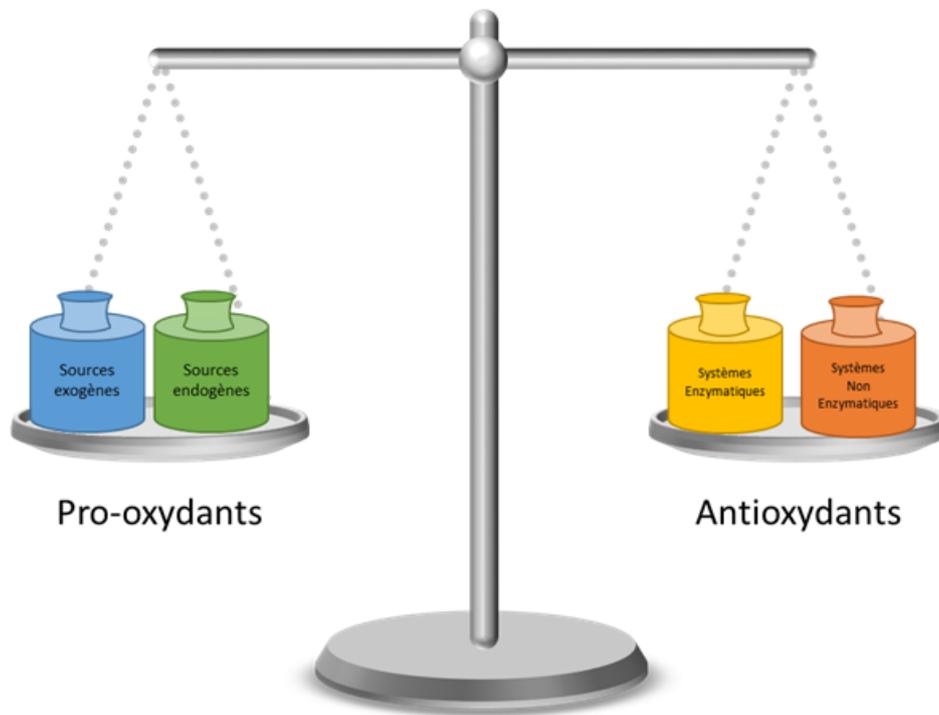


Figure 35. Représentation schématique de la balance oxydante. Un bon équilibre entre la production de pro-oxydants et l'action des antioxydants contribue au maintien de l'homéostasie. Lorsque cette balance est déséquilibrée, par une production en excès de pro-oxydants, d'origine exo- ou endogène, et/ou une trop faible activité antioxydante (enzymatique ou non), l'équilibre redox de la cellule est rompu. Ce déséquilibre qui engendre des dommages au niveau de différents constituants cellulaires est appelé stress oxydant. (d'après Delattre *et al.*, 2005).

Tableau 7. Principales espèces réactives azotées et oxygénées produites dans les cellules. Qu'elles soient issues de la métabolisation de l'azote ou de l'oxygène, ces espèces pro-oxydantes peuvent être de nature radicalaire ou non. ERO = Espèces Réactives Oxygénées ; ERA = Espèces Réactives Azotées.

Espèces réactives	Nom	Formule
ERO	Acide hypochloreux	HOCl
	Anion ou radical superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
	Oxygène singulet	1O_2
	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
	Radical hydroxyle	HO^{\cdot}
ERA	Acide hypothiocyanique	HOSCN
	Dioxyde d'azote	$^{\cdot}NO_2$
	Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
	Nitroperoxycarboxylate	$ONOOCO_2^-$
	Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

Le stress oxydant : ERO, hic de l'homéostasie ?

En conditions physiologiques, le dioxygène O_2 , gaz indispensable à la vie, est nécessaire à la production d'énergie chez les organismes eucaryotes ou les procaryotes vivant en aérobiose. Au cours de l'évolution, l'adaptation des organismes au dioxygène s'est donc traduite par l'apparition d'enzymes favorisant sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits chimiquement très réactifs tels que les radicaux libres de l'oxygène ou les peroxydes. En effet, ces espèces, nommées espèces réactives de l'oxygène (ERO), plus connues sous le nom de ROS (*Reactive Oxygen Species*), présentent une toxicité plus importante que celle du dioxygène lui-même. Il existe dans les cellules un équilibre nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire, entre la production de ces métabolites, dits pro-oxydants, et les systèmes de régulation mis en place par la cellule, appelés antioxydants. Lorsqu'un déséquilibre de la balance pro-/anti-oxydants apparaît, dû à une surproduction d'ERO et/ou un déficit en antioxydants, la cellule est en situation dite de stress oxydant (Figure 35).

Les ERO sont majoritairement produites par les cellules et sont généralement considérées comme des produits toxiques issus du métabolisme pouvant altérer des constituants lipidiques, protéiques, nucléotidiques, et entraîner ainsi des lésions tissulaires, voire la mort cellulaire (Bevilacqua *et al.*, 2012). Aussi, les ERO peuvent être associées à différentes maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, des diabètes, des athéroscléroses ou encore des cancers (Wang *et al.*, 2013). De plus, il existe également des espèces réactives azotées (ERA, dont certaines espèces sont également des ERO), ou RNS (*Reactive Nitrogen Species*), radicalaires ou non, qui peuvent aussi jouer un rôle dans le stress oxydant (Tableau 7).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux ERO produites chez l'abeille lors d'une infection par le parasite *Nosema ceranae* et/ou lors d'une exposition chronique à de faibles doses de fipronil.

1. Les différentes Espèces Réactives de l'Oxygène

Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres de l'oxygène (RLO), des ions oxygénés et des peroxydes, rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés (Tableau 7).

Initialement, l' O_2 possède deux doublets non liants sur ses orbitales externes. Dans cet état, la molécule est stable et ne présente qu'un faible pouvoir oxydant. Cependant, sa métabolisation par la cellule entraîne la formation de RLO (radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, hydroxyle HO^{\bullet} , monoxyde et dioxyde d'azote, NO^{\bullet} et $^{\bullet}NO_2$) qui possèdent un électron célibataire sur la couche externe de l'atome d'oxygène, et ont un temps de demi-vie très court.

En effet, très réactifs de par leur structure électronique instable, les RLO vont tendre à échanger des électrons lors d'une réaction chimique ou d'un ré-appariement avec d'autres radicaux. Ces transformations peuvent engendrer l'apparition de nouvelles espèces radicalaires et former ainsi deux types de radicaux libres : les radicaux libres primaires, initiateurs de la réaction, et les radicaux libres secondaires qui découlent de cette réaction. De plus, l'utilisation de l'oxygène moléculaire par la cellule peut aboutir à d'autres radicaux libres primaires comme l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ ou le radical hydroxyle HO^{\cdot} . Il est à noter que le radical hydroxyle HO^{\cdot} et l'anion hydroxyle HO^- sont deux espèces chimiques nettement distinctes, puisque tous les électrons périphériques de l' HO^- sont appariés, tandis qu' HO^{\cdot} présente un électron célibataire sur sa couche périphérique. Leur différence de réactivité est directement corrélée à cette spécificité de structure électronique. Aussi, les radicaux libres primaires ne sont pas uniquement le résultat d'un stress oxydant mais peuvent également être générés au cours du métabolisme normal de l'oxygène, dans ce cas toutefois, en très faible quantité.

Les peroxydes, qui ne sont pas des radicaux libres mais des molécules contenant un groupe fonctionnel de formule générale R-O-O-R', sont également des ERO. C'est le cas du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est un intermédiaire réduit de l'oxygène relativement toxique. Formé à partir de deux anions superoxydes, il est lui-même générateur d' HO^{\cdot} selon la réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\cdot} + Fe^{3+} + HO^-$ (Wardman & Candeias, 1996).

Le peroxyde nitrite ($ONOO^-$) est le second peroxyde majoritaire dans les cellules. Il est issu de la réaction entre l'ion superoxyde et une molécule de monoxyde d'azote générée par des enzymes nommées oxyde nitrique synthases (NOS) : $O_2^{\cdot-} + \cdot NO \rightarrow ONOO^-$. Le peroxyde nitrite est initiateur d'autres espèces réactives azotées telles que le dioxyde d'azote ($\cdot NO_2$) ou le nitroperoxydicarboxylate ($ONOOCO_2^-$) (Radi, 2013).

51

2. Les sources de production des ERO : paradoxe du stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent dans certains cas être la conséquence d'une action extérieure (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013), et leurs effets sur les organismes varient en fonction de la durée et de l'intensité de l'exposition, de l'état de santé de l'individu ou du potentiel antioxydant de ce dernier.

Cependant, la majeure partie des espèces réactives de l'oxygène provient de l'organisme lui-même. En effet, les ERO sont générées par des voies différentes dans de nombreux processus cellulaires, et leur production est stimulée par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (Barouki, 2006). Elles apparaissent comme des sous-produits du métabolisme normal de la cellule puisque ce sont des molécules importantes de la signalisation cellulaire, ainsi que de la régulation des métabolismes ou du maintien d'un environnement redox optimal, nécessaires au bon fonctionnement

des réactions biochimiques cellulaires (Wang *et al.*, 2013). Le paradoxe réside dans le fait que les ERO peuvent être néfastes au métabolisme tout en étant indispensables au fonctionnement des cellules elles-mêmes (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013). Il en va de même pour les espèces réactives azotées telles que le peroxy-nitrite qui peut être impliqué dans les processus d'apoptose, mais qui joue également un rôle essentiel comme agent antibactérien (Radi, 2013).

2.1. Facteurs exogènes

Les organismes vivants sont constamment exposés à des oxydants issus de l'environnement. Les ERO peuvent ainsi être générées par l'action de molécules chimiques comme les métaux, les gaz et fumées de combustion, les hydrocarbures, les aérosols ou divers produits chimiques tels que les médicaments ou les pesticides. Elles peuvent aussi être produites de processus physiques tels que les irradiations de types électromagnétiques, ionisantes ou ultraviolets, ou encore suite à des contraintes mécaniques appliquées sur l'organisme et même provenir de l'alimentation (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013). En effet, l'action photochimique des UV par exemple entraîne la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ à partir de la molécule d' O_2 .

Les pesticides, et notamment le fipronil sont considérés comme des facteurs pro-oxydants, entraînant des déséquilibres de la balance oxydante. La toxicité du fipronil a surtout été étudiée *in vitro* en culture cellulaire, à des doses beaucoup plus élevées que celles utilisées lors des études menées *in vivo* sur les abeilles. L'étude de Ki et collaborateurs sur des cellules neuronales (lignée SH-SY5Y) a permis de considérer le fipronil à forte concentration (de 50 à 100 μM , soit 21,9 à 43,8 g/L) comme une molécule pro-oxydante, c'est-à-dire productrice d'espèces réactives oxygénées (ERO), ainsi qu'une molécule capable d'induire l'apoptose cellulaire en activant les caspases 3 et 9. L'addition d'un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC) atténuait ces effets néfastes pour la cellule, mettant en lumière l'importance que jouerait le stress oxydant dans la cytotoxicité induite par le fipronil sur ces cellules nerveuses (Ki *et al.*, 2012). Nicodemo et collaborateurs ont montré quant à eux que le fipronil (25 à 100 μM , soit 10,9 à 43,8 g/L) engendrait une inhibition de la production d'ATP dans les mitochondries isolées de la tête et du thorax des abeilles, et ceci de manière dose-dépendante (Nicodemo *et al.*, 2014). De plus, certaines études ont montré une augmentation des enzymes antioxydantes, en particulier la catalase, pouvant être une réponse de l'organisme aux capacités pro-oxydantes du fipronil (Carvalho *et al.*, 2013; Renzi *et al.*, 2016; Kairo *et al.*, 2017).

2.2. Facteurs endogènes

Plusieurs organites peuvent être à l'origine de la production des ERO. C'est même la principale origine des ERO dans les cellules qui sont produites en permanence.

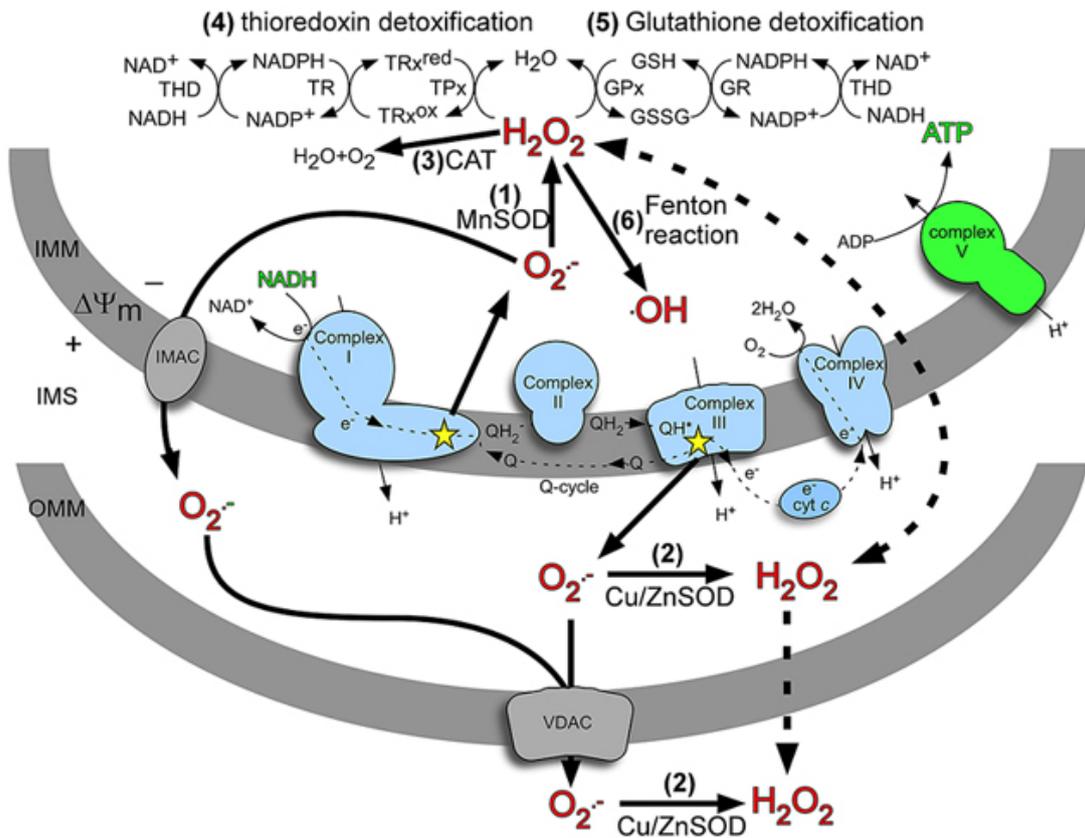


Figure 36. Production et élimination des ERO suite à la respiration mitochondriale. L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ est généré par la chaîne respiratoire et libéré en grande partie dans la matrice mitochondriale depuis le complexe I, mais aussi dans l'espace intermembranaire (IMS) *via* le complexe III. Cette libération est matérialisée par les étoiles jaunes. L' $O_2^{\bullet-}$ est ensuite soit dismuté en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), soit catalysé par des enzymes superoxydes dismutases appelées SOD, à manganèse (MnSOD) dans la matrice mitochondriale (1), à cuivre ou à zinc (Cu/ZnSOD) dans l'espace intermembranaire ou dans le cytosol (2). L' H_2O_2 sera détoxifié dans la matrice par une catalase (CAT) (3), le système thiorédoxine (TRx)/thiorédoxine peroxydase (TPx) (4), ou le système glutathion (GSH)/glutathion peroxydase (GR) (5). L' H_2O_2 peut également réagir avec des ions Fe^{2+} selon la réaction de Fenton (6). L' $O_2^{\bullet-}$, ne diffusant pas au travers des membranes, passe au travers de canaux ioniques (traits pleins) : IMAC (*Inner Membrane Anion Channel*, ancré dans la membrane interne (IMM)) et VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*, ancré dans la membrane externe (OMM)). *A contrario*, l' H_2O_2 peut diffuser librement au travers des membranes (traits pointillés), et être libéré dans le cytosol de la cellule. GSSG, glutathion disulfide ; THD : transhydrogénase ; TR : thiorédoxine réductase ; TRx^{red} : thiorédoxine réduite ; TRx^{ox} : thiorédoxine oxydée ; $\Delta\Psi_m$: potentiel membranaire (d'après Batty *et al.*, 2009)

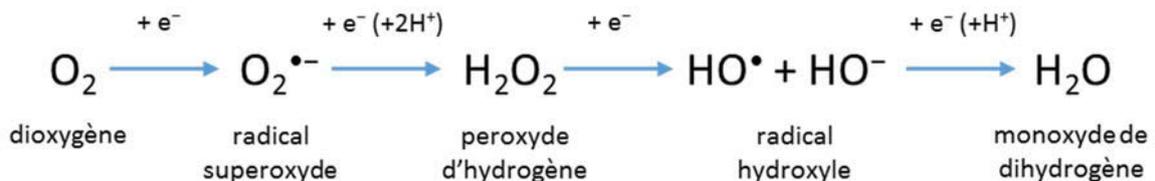


Figure 37. Réduction tétravalente de la molécule de dioxygène en H_2O : production d'ERO intermédiaires au cours de la respiration mitochondriale. Quatre étapes successives de réduction monoélectronique de l' O_2 sont réalisées à partir du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, produisant chacune une espèce réactive oxygénée. Si les ERO intermédiaires ne sont pas réduites, elles sont libérées dans la matrice mitochondriale et le cytosol (d'après Cadenas and Davies, 2000).

2.2.1. La respiration mitochondriale

L'une des principales sources de production d'ERO, et par conséquent de stress oxydant, est la mitochondrie. En effet, au cours de la respiration mitochondriale qui conduit à la formation d'ATP, il peut y avoir formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ par transfert d'énergie ou bien formation de radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ces derniers peuvent être générés suite à une déperdition d'électrons depuis le complexe I (NADH-déshydrogénase) et le complexe III (cytochrome-bc1 oxydase) de la chaîne respiratoire (Figure 36). L' O_2 est utilisé comme accepteur final d'électrons par le complexe IV (cytochrome-c oxydase) (Batty *et al.*, 2009). Ce complexe catalyse la réduction tétravalente de la majorité du dioxygène entrant dans la cellule, soit un ajout de quatre électrons, entraînant la production d'eau selon la réaction suivante : $\text{O}_2 + 4 e^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$

Les quatre électrons étant transférés successivement à la molécule d' O_2 , ils peuvent conduire à la production d'ERO intermédiaires : $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et HO^\bullet (Figure 37). En effet, certains électrons contribuent à la réduction monoélectronique de l'oxygène (addition d'un seul électron) selon la réaction suivante : $\text{O}_2 + 1 e^- \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-}$. Ainsi, environ 2% du dioxygène entraînent la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Cadenas & Davies, 2000).

Les ERO générés peuvent engendrer des lésions oxydatives sur l'ADN mitochondrial (Delattre *et al.*, 2005; Shokolenko *et al.*, 2009), mais aussi sur les protéines et les lipides de ses membranes. Partiellement réduits et très réactifs, des métabolites de l' O_2 peut aussi être rejetés de la mitochondrie au cours de réactions de transferts d'électrons et atteindre les cibles cytosoliques (Bevilacqua *et al.*, 2012). Par ailleurs, la membrane mitochondriale externe renferme une monoamine oxydase qui catalyse les monoamines et entraîne une production simultanée de H_2O_2 : $\text{O}_2 + 2 e^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

Les enzymes antioxydantes présentes dans les mitochondries (catalases et superoxydes dismutases) sont les premières lignes de défense de la mitochondrie contre l'oxydation induite par les ERO (Figure 36). Ces enzymes permettent de stopper la formation d'anion superoxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$) hautement réactifs et toxiques et initiateurs d'autres ERO, et peuvent ainsi limiter leur propagation dans le cytosol de la cellule.

2.2.2. NOX et DUOX

Les NAD(P)H oxydases (NOX/DUOX) sont des complexes enzymatiques transmembranaires dont l'activité catalytique, contrôlée par le recrutement du cofacteur FAD, permet la réduction de l'oxygène en utilisant le NADH ou NADPH comme donneur d'électrons. Au total, sept isoformes ont été décrites : les NOX 1 à 5 et les DUOX (dual oxydases) 1 et 2. Le recrutement de protéines accessoires cytosoliques (pour les NOX 1 à 4), ou la présence de Ca^{2+} (pour NOX 5, DUOX 1 et 2), est essentiel à leur activité (Guichard *et al.*, 2008; Kuraishi *et al.*, 2013) (Figure 38). Les électrons issus de l'oxydation du NADPH,

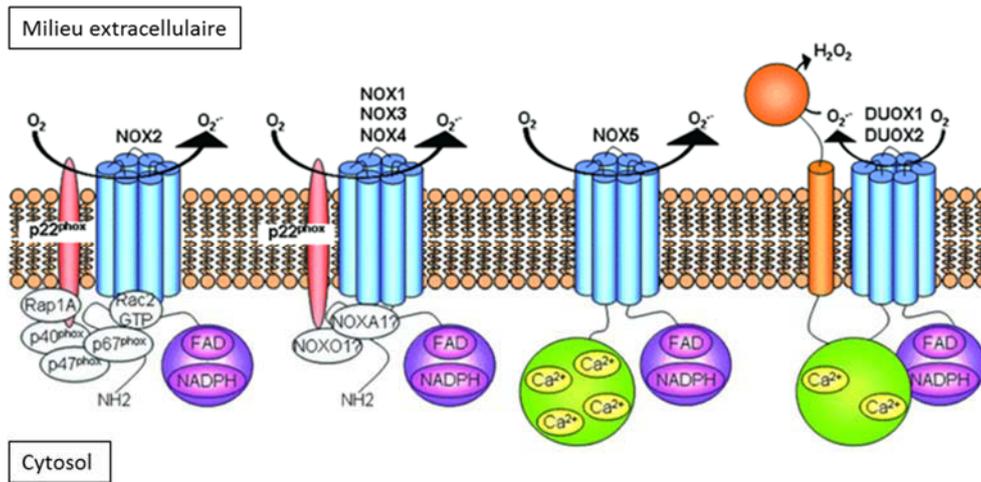


Figure 38. Les sept isoformes de NADPH oxydases (NOX/DUOX) actuellement décrites. La famille des NADPH oxydases, est composée de sept isoenzymes, 5 NOX et 2 DUOX (*dual oxidase*) dont la fonction est de réduire l'oxygène moléculaire (O_2) en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Les NOX forment un complexe protéique, constitué d'un complexe hémique (en bleu) dont l'inclusion dans la membrane est favorisée par la présence du cofacteur FAD. Ce dernier permet le transport de l'électron du NADPH oxydé à l'hème. L'électron est ensuite pris en charge par l'hème et chargé sur la molécule d' O_2 , soit *via* la protéine $p22^{phox}$ (NOX 1 à 4), soit directement par l'hème (NOX 5, DUOX 1 et 2). Dans le premier cas, l'activation du complexe est possible grâce au recrutement préalable de protéines accessoires cytosoliques servant de pont entre $p22^{phox}$ et l'hème ou, dans le second cas, par la présence d'ions Ca^{2+} . Lorsque les complexes NOX sont activés, les molécules d' O_2 vont être réduites en anions superoxydes et libérées au-delà de la membrane. L' $O_2^{\cdot-}$ généré par les DUOX va quant à lui être réduit en H_2O_2 (d'après Guichard *et al.*, 2008).

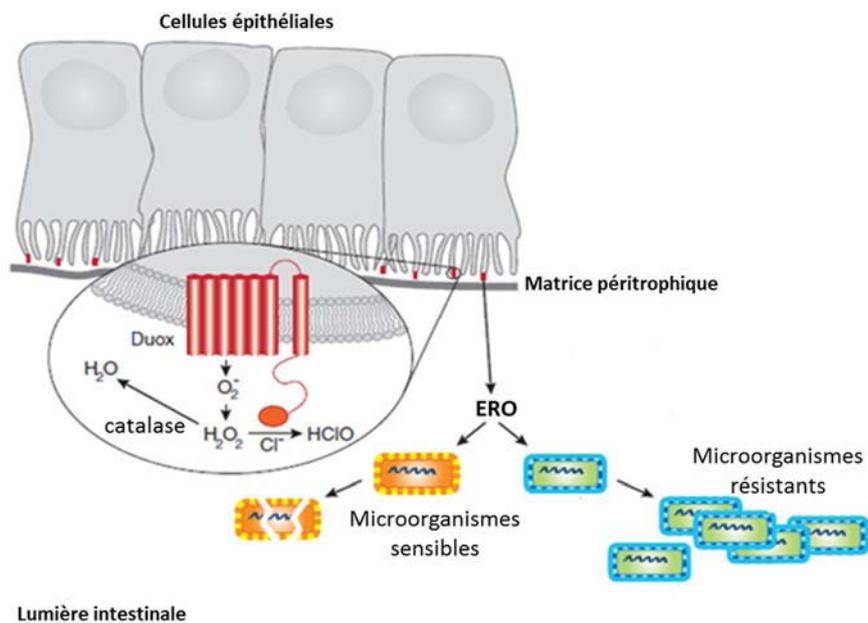


Figure 39. DUOX et immunité intestinale chez les insectes. Les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites à partir de la NADPH oxydase transmembranaire DUOX, localisée dans la membrane plasmique des microvillosités des cellules intestinales. L' $O_2^{\cdot-}$ généré va être réduit en H_2O_2 . Ce dernier en présence d'ions chlorure Cl^- est transformé en acide hypochloreux HOCl permettant de dégrader la membrane des microorganismes. L' H_2O_2 peut également être pris en charge par une catalase, pour produire de l' H_2O . Les ERO relarguées au-delà de la membrane péritrophique (PM) vont alors agir sur les microorganismes présents. Certains vont s'avérer sensibles à l'action des ERO et seront éliminés, tandis que d'autres peuvent être résistants aux ERO, mais seront peut-être sensibles à l'action de peptides antimicrobiens (PAM) produits conjointement aux ERO (d'après Lemaitre and Hoffman 2007).

transférés successivement au FAD puis au groupe hémique de la partie transmembranaire, sont transmis aux molécules d'O₂ générant ainsi des anions superoxydes dans le milieu extracellulaire : $2O_2 + NAD(P)H \rightarrow 2O_2^{\bullet-} + NAD(P)^+ + H^+$ (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013).

Plusieurs études indiquent que les DUOX jouent un rôle essentiel dans l'immunité des insectes. En effet, ce complexe enzymatique a été localisé dans la membrane des cellules épithéliales de l'intestin de la drosophile. Comme le montre la [figure 38](#), les DUOX génèrent de l'H₂O₂ dans le milieu extracellulaire. Or, en conditions physiologiques normales, l'H₂O₂ est éliminé par des catalases, mais en cas d'infection, il est transformé par la myéloperoxydase en acide hypochloreux HOCl (Kohen & Nyska, 2002) capable de réagir avec les lipides et les acides aminés oxydables des agents pathogènes (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Kim & Lee, 2014) ([Figure 39](#)).

En plus de leur implication dans la protection de l'intestin chez la drosophile, les DUOX semblent jouer un rôle prépondérant dans le maintien de son intégrité ainsi que dans son développement. En effet, il a été montré que le complexe DUOX était impliqué dans la formation de la membrane péritrophique chez les anophèles et les drosophiles (Kim & Lee, 2014). De plus, l'H₂O₂ produit par DUOX semble être une molécule signal du renouvellement cellulaire depuis les cellules souches de l'intestin. Les ERO produites pourraient en effet moduler l'intensité de la réponse des cellules souches, notamment au cours des processus de différenciation (Kim & Lee, 2014). Les gènes codant pour deux NOX (NOX 5 et DUOX) ont été retrouvés chez l'abeille, mais leur rôle n'a, à l'heure actuelle, pas encore été clairement défini (Kawahara *et al.*, 2007).

54

2.2.3. Les autres compartiments cellulaires

a. Le réticulum endoplasmique

Les cytochromes P450 (CYP450), qui sont présents dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse, sont des hémoprotéines fer-souffre. Ils interviennent dans la détoxification de xénobiotiques, mais aussi dans le métabolisme des lipides et des protéines (Delattre *et al.*, 2005), en utilisant l'O₂ selon la réaction finale : $RH + O_2 + (NAD(P)H, H^+) + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+$ (Hrycay & Bandiera, 2015).

Pour aboutir à l'hydroxylation finale, les CYP450 subissent plusieurs étapes séquentielles au cours desquelles des ERO des radicaux superoxydes, par réduction de l'oxygène moléculaire O₂ en O₂^{•-}, ou du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Bevilacqua *et al.*, 2012; Hrycay & Bandiera, 2015). Ainsi, en détoxiquant une molécule, et notamment un pesticide, les cytochromes pourraient augmenter la quantité de pro-oxydants dans la cellule.

b. Peroxysomes et lysosomes

Les peroxysomes sont chargés de la détoxification de la cellule par dégradation du peroxyde d'hydrogène très toxique grâce à une catalase. L' H_2O_2 est issu notamment de la β -oxydation des acides gras (ayant lieu dans les mitochondries et les peroxysomes chez les mammifères), et de la détoxification de molécules présentes dans certains tissus comme le foie et les reins. Toutefois le peroxyde d'hydrogène ne représente qu'une part des ERO totales produites (Delattre *et al.*, 2005).

La myéloperoxydase (MPO), présente dans les lysosomes et participant à la formation du phagosome dans les cellules phagocytaires (Dupré-Crochet *et al.*, 2013), est également responsable de la formation d'ERO, directement par production d'acide hypochloreux HOCl à partir de l' H_2O_2 , et l'acide thiocyanique HOSCN, et indirectement par la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ et de radical hydroxyle HO^\bullet (Delattre *et al.*, 2005). Enfin, les enzymes de la voie de métabolisation de l'acide arachidonique, les lipo-oxygénases (LOX) et les cyclo-oxygénases (COX), sont également des sources de production d'ERO (Delattre *et al.*, 2005).

3. Les ERO : bonnes ou mauvaises pour la cellule ?

3.1. Le pouvoir protecteur des ERO

Les ERO jouent plusieurs rôles au sein de l'organisme et de la cellule, et participent notamment à leur protection contre les pathogènes. En effet, chez les mammifères, les cellules phagocytaires, les granulocytes neutrophiles et les macrophages, sont les premiers acteurs de la défense immunitaire. Ces cellules constituent une importante source d'ERO, notamment de radicaux libres oxygénés. Lorsqu'elles sont en quiescence, les cellules immunitaires consomment peu d'oxygène tandis qu'en présence de particules à phagocyter telles que des bactéries invasives, elles forment un phagosome autour du matériel à détruire, stimulant la consommation d' O_2 et par conséquent, la production d'ERO comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 *via* les NOX membranaires à l'intérieur du phagosome.

Actuellement, les mécanismes par lesquels les ERO participent à la destruction des agents pathogènes sont encore sujets à débat au sein de la communauté scientifique. Le HOCl produit par les MPO semble jouer un rôle prépondérant puisqu'il peut réagir avec n'importe quel groupe oxydable, notamment au niveau des lipides et des acides aminés. En outre, le peroxyde d'hydrogène, présent à l'intérieur du phagosome, participe aux dommages induits aux bactéries piégées (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). Moins réactif que l'HOCl, l' H_2O_2 peut subir la réaction de Fenton, et augmenter ainsi son pouvoir oxydant par la production d' HO^\bullet (Wardman & Candeias, 1996). De plus, lorsque les pathogènes sont de trop grande taille pour être phagocytés (*e.g* hyphes d'*Aspergillus fumigatus*), les granulocytes

neutrophiles excrètent les ERO produites par la NOX 2 dans le milieu extracellulaire (Dupré-Crochet *et al.*, 2013).

Chez les insectes, les ERO participent à l'immunité dite épithéliale. En effet, il a été montré chez la drosophile que lors d'une infection localisée au niveau de l'intestin, les cellules épithéliales induisent leur propre défense par la production de peptides antimicrobiens (PAM) (Figure 25), mais également d'ERO *via* la DUOX présente au pôle apical des cellules épithéliales de l'intestin (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Kim & Lee, 2014; Lee *et al.*, 2015b) (Figure 39).

3.2. Signalisation cellulaire et régulation des ERO

Plusieurs systèmes de contrôle permettent de limiter la production d'ERO dans les cellules. La régulation de la production des ERO par les NOX est ainsi opérée à différents points qui varient en temps, en lieu, et en fonction du type cellulaire. Par exemple, la régulation de l'activité des complexes NOX se fait par l'incorporation plus ou moins rapide de cofacteurs (FAD ou Ca^{2+}) et par la phosphorylation des protéines accessoires (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013) (Figure 38). Les ERO générées par les NOX, semblent agir comme des molécules de signalisation en modifiant l'état d'oxydo-réduction des lipides ou des protéines, les NOX pouvant être leur propre cible. En effet, $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 agissent sur les sous-unités des NOX avant leur assemblage, entraînant ainsi la diminution de la production d'ERO. Ce rétrocontrôle est également observé lors de la peroxydation des phospholipides puisque les lipides oxydés inhibent eux-mêmes la production d'ERO, le mécanisme d'action n'étant pas connu (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). Les activités de certaines kinases et phosphatases semblent aussi être régulées dans certaines conditions par les ERO.

Il est, à l'heure actuelle, difficile d'évaluer l'importance des espèces réactives de l'oxygène dans la signalisation puisqu'elles régulent non seulement des protéines, mais aussi des lipides et que leurs actions sont locales et peuvent donc concerner seulement une faible fraction de molécules cibles. De plus, la régulation résultant des ERO varie en fonction de leur nature et de leur quantité, de même que les réactions qu'elles induisent. Aussi, en plus des rétrocontrôles existants, les ERO intracellulaires sont également régulées par des enzymes et des composés non enzymatiques appelés antioxydants.

La production des ERO peut être induite par de nombreux ligands extracellulaires après fixation à leurs récepteurs spécifiques tels que les récepteurs à cytokines, à tyrosine kinases, à sérine/thréonine kinases, ou couplés aux protéines G ou des canaux ioniques. Les ERO ainsi produites contribuent à la transduction du signal en amplifiant ce dernier initialement induit par la liaison ligand/récepteur. Cette amplification est réalisée par deux mécanismes principaux : une modification de l'équilibre redox intracellulaire et leur modification de l'état oxydatif des protéines (Delattre *et al.*, 2005).

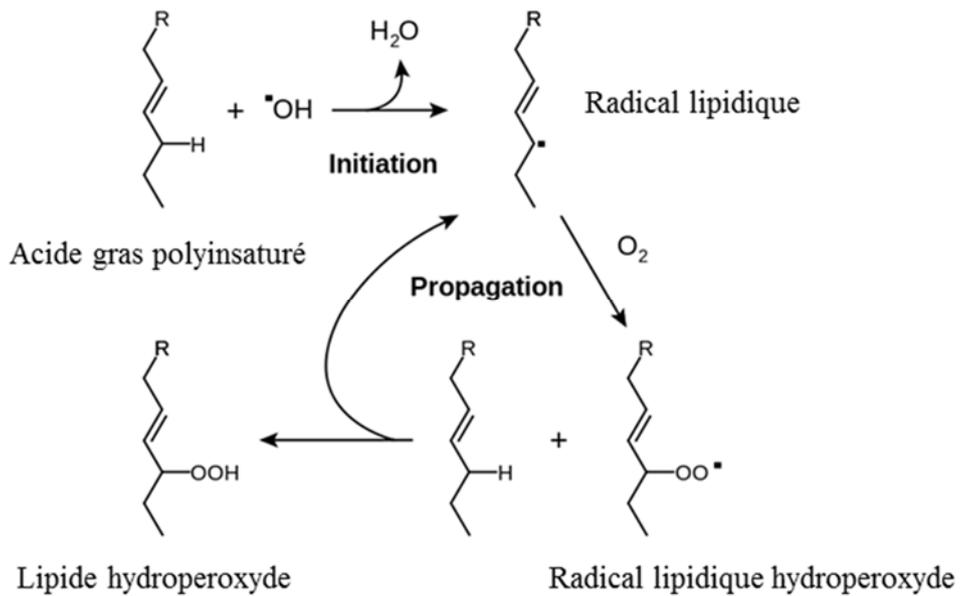


Figure 40. Mécanismes de peroxydation des lipides par les espèces réactives oxygénées (ERO). La peroxydation des lipides se déroule en trois étapes : (i) l'initiation où les lipides vont être oxydés principalement par le radical hydroxyle $\text{HO}\cdot$, (ii) la propagation durant laquelle l'oxydation va se répandre de proche en proche, et enfin (iii) l'arrêt de la propagation par fusion de deux radicaux ou par interaction avec un antioxydant (d'après Kohen and Nyska, 2002).

Parmi les ERO participant à la transduction du signal, l' $O_2^{\bullet -}$ est le plus apte à avoir une action localisée lorsqu'il est produit à l'intérieur de la mitochondrie puisqu'il ne diffuse pas au travers des membranes. Cependant, il peut être exporté de la mitochondrie vers le cytosol *via* des canaux ioniques (Figure 36) et atteindre d'autres cibles plus éloignées du site de production, sans pour autant pénétrer facilement à l'intérieur des autres organites. *A contrario*, l' H_2O_2 peut traverser les membranes des différents organites, en fonction de la composition membranaire (composition lipidique, perméabilité, présence d'aquaporines) (Bienert *et al.*, 2006; Bienert & Chaumont, 2014). Cependant, sa forte réactivité et la présence d'antioxydants assurent également une action localisée de ce peroxyde à son lieu de synthèse et limitent sa propagation (Kohen & Nyska, 2002).

3.3. Lipides, protéines et ADN : les cibles favorites des ERO

Une accumulation d'ERO dans les cellules entraîne des dommages sur différents composants cellulaires. Comme nous l'avons vu précédemment, leur forte réactivité avec les molécules biologiques, et donc leur très courte durée de vie, ne leur permettent pas de se distribuer dans l'environnement intracellulaire et limitent donc leur capacité à causer des dommages à distance de leur site de formation. Cependant, les métabolites de l'oxygène présentant une plus faible réactivité (tel que l' $O_2^{\bullet -}$) peuvent persister dans l'environnement intracellulaire durant de plus longues périodes et pourraient ainsi atteindre des cibles éloignées de leur site de production.

Parmi les cibles les plus vulnérables aux dommages oxydatifs, les lipides, les protéines membranaires et l'ADN sont le plus souvent touchés par l'action des ERO, mais d'autres molécules comme les sucres ne sont pas pour autant épargnées.

Toutes les membranes cellulaires sont particulièrement vulnérables à l'oxydation en raison de leur richesse en acides gras insaturés. Ce phénomène de dommages causés aux lipides insaturés est appelé « peroxydation des lipides » ou « lipoperoxydation ». Il se déroule en trois étapes (Figure 40) : (i) une phase d'initiation, essentiellement déclenchée par HO^{\bullet} et durant laquelle un réarrangement moléculaire va s'effectuer, (ii) une phase de propagation où l'acide gras modifié va entraîner la modification des acides gras voisins en présence d' O_2 , et (iii) une phase finale caractérisée par l'arrêt de la propagation suite à l'interaction de deux radicaux ou d'un antioxydant (Kohen & Nyska, 2002).

Les protéines localisées dans les membranes cellulaires, ainsi que les protéines libres du cytoplasme, peuvent également être la cible de radicaux et des peroxydes. Leur oxydation entraîne une modification de certains acides aminés (notamment ceux porteurs de groupements thiols -SH), et la formation de groupements carbonyles ($>C=O$) pouvant conduire à une modification de leur structure tertiaire. Les protéines ainsi modifiées peuvent perdre leur activité (entraînant éventuellement la perte d'une fonction cellulaire), altérer le potentiel électrochimique membranaire, et être plus

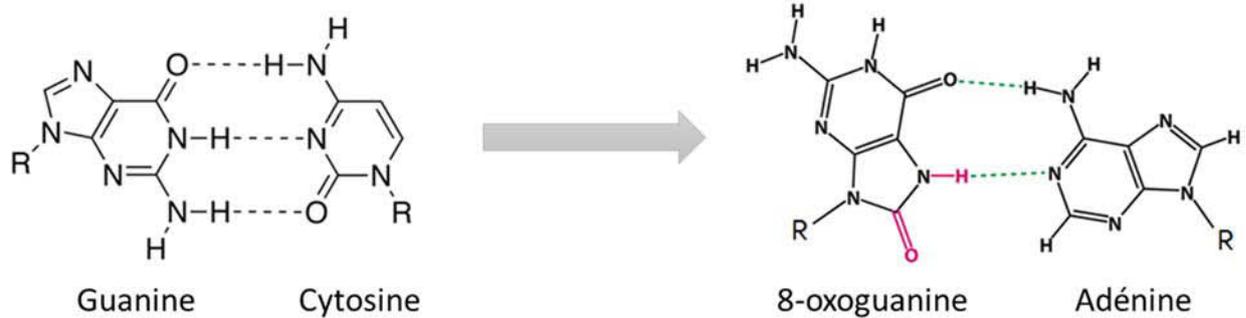


Figure 41. Oxydation de la guanine et mésappariement. L'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine (en rose sur le schéma de droite), majoritairement induite par le radical hydroxyle HO^\bullet , entraîne un mésappariement de la guanine. Normalement appariée avec la cytosine, la guanine une fois oxydée peut se lier avec l'adénine, bien qu'elle soit toujours capable de se lier à la cytosine (d'après Kohen and Nyska, 2002).

susceptibles à la dégradation protéolytique (Kohen & Nyska, 2002). De même que la lipoperoxydation, l'oxydation des protéines est un processus continu, et c'est lorsque la quantité de protéines oxydées excède celle de leur élimination que les lésions cellulaires apparaissent.

Enfin, les acides nucléiques n'échappent pas à l'action des ERO. En effet, bien que l'ADN soit une molécule stable et protégée, certains ERO peuvent interagir avec elle et causer divers dommages : modification des bases de l'ADN (oxydation de la guanine en 8-oxoguanine) pouvant générer des modifications d'appariements (Figure 41), cassures de l'ADN simple ou double brin, altération des bases, atteintes des désoxyriboses, excisions de bases, dommages induits aux systèmes de réparation de l'ADN et modification de l'expression des gènes. La plupart de ces dommages sont attribués aux radicaux hydroxyles HO^{*} (Kohen & Nyska, 2002) puisqu'ils sont les plus réactifs vis-à-vis des composants de l'ADN. Cependant, l'enveloppe nucléaire possède également des cytochromes oxydases et une chaîne de transport des électrons dont la fonction n'est pas encore bien connue. À l'instar de la mitochondrie, une perte d'électrons peut se produire, générant des anions superoxydes très réactifs à proximité de l'ADN nucléaire.

3.4. Le processus de vieillissement

L'augmentation de l'incidence de certaines pathologies avec l'âge a été expliquée par de nombreuses théories. Parmi ces théories, l'influence des facteurs immunologiques, neuroendocrinologiques, ou génétiques est souvent soulevée, mais aussi la théorie radicalaire, avancée par Harman dès 1956, selon laquelle une augmentation des processus oxydants apparaît au cours du vieillissement (Roussel & Ferry, 2002). Cette théorie met en avant l'accumulation d'agressions oxydantes provenant du métabolisme de l'oxygène et de l'azote, additionnée d'un déficit des moyens de défenses antiradicalaires. Le déséquilibre de la balance pro- et antioxydants favoriserait la sénescence, et entraînerait alors une altération des fonctions physiologiques et une augmentation de la sensibilité face aux maladies (Barouki, 2006). En effet, lors du vieillissement de la cellule, notamment chez *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Saccharomyces cerevisiae*, l'équilibre redox des cellules est modifié et la production d'ERO augmente, engendrant des altérations cellulaires telles que celles présentées dans le paragraphe précédent qui s'accumulent au cours du temps (Ayer *et al.*, 2013). Parallèlement, l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN diminue avec l'âge entraînant une fixation et une accumulation des anomalies. Depuis quelques années, la réciproque de cette hypothèse selon laquelle le processus de vieillissement serait producteur d'ERO a également été envisagée (Barouki, 2006).

3.5. ERO *or not* ERO : déclenchement des processus d'apoptose et d'autophagie

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un processus durant lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est un processus essentiel de la régulation de la population cellulaire. Ce mécanisme, généralement bénéfique pour l'organisme (élimination de cellules vieillissantes, endommagées, infectées ou cancéreuses) pourrait s'avérer délétère s'il était déclenché en excès. Le processus apoptotique se caractérise par un gonflement du noyau, une désorganisation de la chromatine et une dégradation de l'ADN, une formation de prolongements cytoplasmiques par la cellule qui se détachent en corps cellulaires, dit corps apoptotiques. Avant sa destruction, la cellule émet des signaux permettant sa prochaine phagocytose par les macrophages.

Les ERO sont impliquées dans les apoptoses spontanées intrinsèques et celles déclenchées par stimulation des récepteurs de manière extrinsèque. Lorsque la cellule subit un stress oxydant, le cytosol subit un déséquilibre redox engendrant une augmentation de la production d'ERO dans la mitochondrie. De plus, la présence importante de ces pro-oxydants cytosoliques autour de la mitochondrie peut également conduire à un stress oxydatif intra-mitochondrial, entraînant un vieillissement cellulaire voire l'apoptose (Delattre *et al.*, 2005).

Un second mécanisme de déclenchement de l'apoptose suite à une exposition aux ERO implique la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP. Cette enzyme de réparation de l'ADN est activée d'une altération oxydative de l'ADN simple brin. La PARP se lie au brin d'ADN et entame la synthèse d'une chaîne poly(ADP-ribose) ou PAR, servant de signal aux autres protéines de réparation de l'ADN. Or, la production d'ADP-ribose nécessite la réquisition de NAD⁺, et la suractivation de PARP, notamment lors d'un stress oxydatif, entraîne une déplétion du taux de NAD⁺, induisant une diminution progressive de l'ATP et un déficit énergétique généralisé dans la cellule conduisant à sa mort (Yu *et al.*, 2006). Parallèlement, la production d'ERO dans la matrice des mitochondries rend son ADN particulièrement sensible aux agressions. De plus, les voies de réparation de l'ADN nucléaire étant plus nombreuses que celles de l'ADN mitochondrial, ce dernier accumule plus de dommages (Yakes & Van Houten, 1997).

Plusieurs études ont également montré que les ERO pouvaient déclencher le processus d'autophagie de la cellule à plusieurs niveaux. Contrairement à l'apoptose, l'autophagie désigne la dégradation d'une partie seulement du cytoplasme, générée par ses propres lysosomes. Elle est souvent déclenchée en situation de stress pour la cellule, comme par exemple l'appauvrissement en nutriments extracellulaires. Les ERO semblent agir comme des molécules signal du déclenchement de l'autophagie. Ce processus enclenché permettrait ainsi de répondre aux besoins nutritifs de la cellule mais aussi de rétablir l'homéostasie cellulaire et réparer les dégâts induits par le stress oxydant précédemment généré (Filomeni *et al.*, 2015).

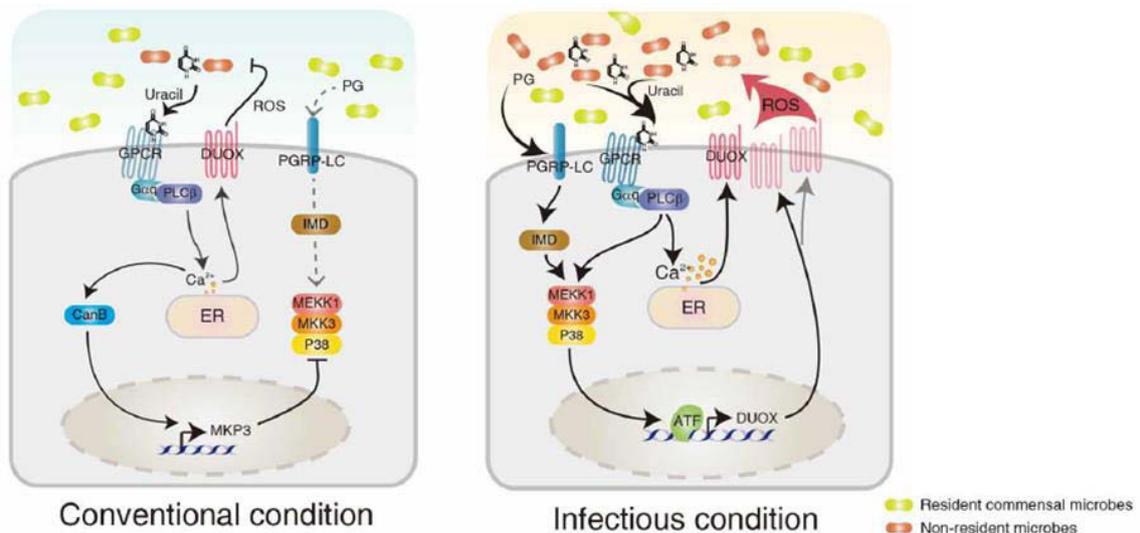


Figure 42. Mécanisme de régulation de la DUOX (dual oxydase) dans la réponse immunitaire innée épithéliale chez la Drosophile. L'immunité épithéliale chez la drosophile en condition normale (à gauche), et lors d'infections par des bactéries pathogènes (à droite). La production d'ERO par la DUOX est induite par l'uracile libéré dans la lumière intestinale par les agents microbiens. L'uracile se fixe sur un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G (GPCR), à Gαq et à la phospholipase PLCβ. La libération de Ca²⁺ est alors induite depuis le réticulum endoplasmique (ER) et active directement DUOX. Son expression est, quant à elle, induite par la voie dite MEKK1-MKK3-p38, activée elle-même par la voie GPCR/Gαq/PLCβ et par la voie IMD, voie de production des peptides antimicrobiens (PAM). En condition normale, l'activité de p38 est inhibée par la calcineurine B (CanB), tandis que la voie IMD est maintenue à un faible niveau grâce à de multiples régulateurs négatifs, et une faible présence de peptidoglycanes (PG) microbiens, activateurs de la voie Imd (*Immune deficiency*). Ces inhibitions permettent ainsi une tolérance de la flore intestinale. Lorsque ces inhibitions sont levées lors d'une infection, la DUOX et les PAM sont produits en grande quantité, permettant ainsi de combattre les agents pathogènes (d'après Kim *et al.* 2014).

3.6. Hôte, microbiote et agents pathogènes : un ménage à trois

Il est important de considérer que l'intestin est un organe colonisé par une flore microbienne qui forme un écosystème complexe¹⁴. Les systèmes de défense doivent donc pouvoir distinguer les microorganismes bénéfiques du microbiote des microorganismes pathogènes. Parfois, le microbiote commensal, initialement non pathogène pour l'organisme peut dans certaines conditions devenir pathogène pour ce dernier. Il est alors nommé « pathobionte » (Kamada *et al.*, 2013).

Les études menées chez les insectes et en particulier chez la drosophile ont montré que l'activité de DUOX est régulée positivement par l'uracile sécrétée par le microbiote intestinal en faible quantité, tandis que les bactéries pathogènes en secréteraient davantage (Ferrandon, 2013; Kim & Lee, 2014; Lee *et al.*, 2015b) (Figure 42). La libération d'uracile entraîne un relargage du Ca²⁺ depuis le réticulum endoplasmique, permettant l'activation de DUOX. Cette activation est régulée par une voie de signalisation nommée PLCβ. Une autre voie de signalisation, la voie MEKK1-MKK3-p38, permet de réguler positivement l'expression du gène codant DUOX. Cette deuxième voie de signalisation, vraisemblablement activée par la première, permet donc d'amplifier la production d'ERO en fonction de la quantité d'uracile présente. Il est intéressant de noter que l'uracile peut également être retrouvé dans n'importe quelle cellule eucaryote et qu'il pourrait donc agir comme une molécule signal relarguée par une cellule endommagée lors d'une infection par un agent pathogène intracellulaire.

60

4. Antioxydants en balance : la protection contre le stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène sont en général présentes à de faibles concentrations dans la cellule. Ces concentrations sont régulées par un équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par des systèmes enzymatiques ou non enzymatiques, les antioxydants (Figure 43), afin de conserver l'intégrité de la balance pro-oxydants/anti-oxydants.

4.1. Les antioxydants enzymatiques

Cette protection est liée à des molécules qui, à faibles doses, sont capables d'entrer en compétition avec les cibles des ERO et peuvent ainsi diminuer ou empêcher leur oxydation. Les superoxydes dismutases ou SOD sont des métalloenzymes dont le site catalytique est successivement réduit puis oxydé par l'anion superoxyde. Il existe deux isoformes cytosoliques, à zinc ou à cuivre (Zn/CuSOD), et une SOD à manganèse (MnSOD) présente dans la matrice mitochondriale (Figure 36). À faible concentration, les ERO mitochondriales peuvent être neutralisées par la MnSOD au niveau de la membrane interne mitochondriale, ainsi que dans la matrice (Bevilacqua *et al.*, 2012). Si le radical

¹⁴ Le microbiote intestinal de l'abeille qui constitue cet écosystème sera développé dans le Chapitre 4.

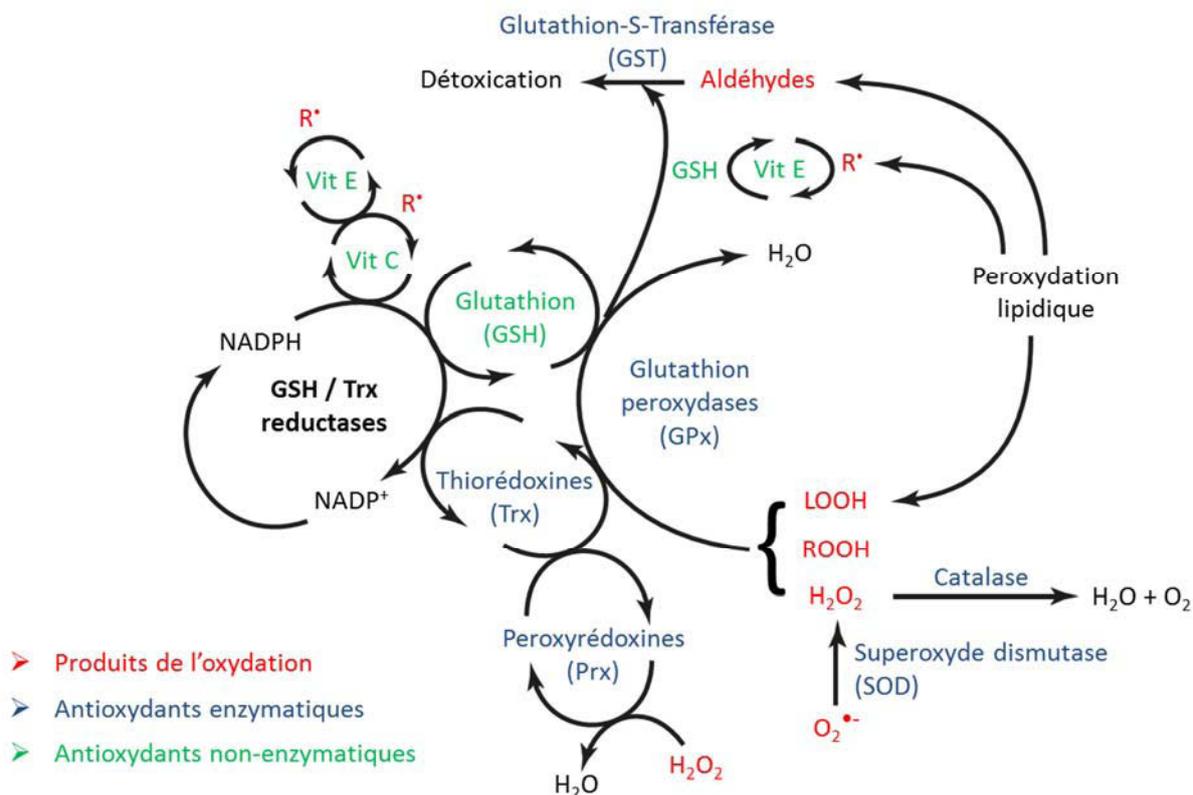
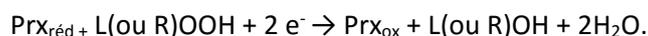


Figure 43. Les systèmes antioxydants. L' O_2 est capable de capter un électron pour former le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$. Ce dernier est catalysé par les superoxydes dismutases (SOD) et forme du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Des hydroperoxydes ROOH et des lipoperoxydes LOOH sont également produits. Les antioxydants enzymatiques tels que les glutathion peroxydases (GPx) permettent la détoxification de ces composés, tandis que la catalase convertit l' H_2O_2 en H_2O . D'autres enzymes telles que les thiorédoxines (Trx), les peroxyrédoxines (Prx) et les glutathion-S-transférases (GST) permettent l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le maintien de l'équilibre entre pro- et antioxydants. En outre, plusieurs composés non enzymatiques, notamment les vitamines E et C (Vit E, Vit C) et le glutathion (GSH), peuvent interagir avec les radicaux et les détoxifier (d'après Delattre *et al.*, 2005; Barouki 2006). (Schéma : Kocer A., communication personnelle). Chez l'abeille, la littérature a décrit notamment la présence de SOD, GPx, GR, GST, Trx, Prx, et CAT (Corona and Robinson 2006).

superoxyde $O_2^{\bullet-}$ n'est pas spontanément dismuté en H_2O_2 , il est pris en charge par les SOD qui vont catalyser cette réaction (Wang *et al.*, 2013) afin de l'éliminer, ou tout du moins de le maintenir à une faible concentration : $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Les SOD inhibent également la peroxydation des phospholipides (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). Les produits de la lipoperoxydation peuvent être aussi pris en charge par la glutathion peroxydase (GPx). C'est une enzyme formée de quatre sous-unités identiques dont le site actif contient du sélénium. À l'instar des NOX, la GPx est présente à l'intérieur des cellules sous deux isoformes : la c-GPX, cytosolique et mitochondriale, et la PH-GPx membranaire (Ursini, 1995). Ces deux isoformes contribuent à la réduction des hydroperoxydes LOOH, mais aussi du peroxyde d'hydrogène en oxydant le glutathion GSH : $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$.

Le peroxyde d'hydrogène peut également être réduit par la peroxyrédoxine (Prx) (Figure 43) selon la réaction : Prx réduit ($Prx_{\text{réd}}$) + $H_2O_2 \rightarrow$ Prx oxydé (Prx_{ox}) + $2H_2O$. Tout comme les enzymes précédentes, elle peut être présente dans le cytosol et dans la mitochondrie, mais aussi dans les chloroplastes des végétaux, ou encore les peroxysomes et associées à la membrane plasmique ou nucléaire (Wood *et al.*, 2003). À plus forte concentration, la Prx exerce aussi un rôle antioxydant sur les lipides oxydés (LOOH) et les protéines oxydées (ROOH) selon la réaction :



La Prx oxydée devient inactive et le transfert d'électrons à la thiorédoxine (Trx) réduite est alors nécessaire pour restaurer son activité catalytique : $Prx_{\text{ox}} + Trx_{\text{réd}} \rightarrow Prx_{\text{réd}} + Trx_{\text{ox}}$.

Enfin, la catalase est formée de quatre groupements hémiques contenant du fer ferrique (Fe^{3+}). Elle est présente au niveau des peroxysomes et catalyse la réduction du H_2O_2 en accélérant la réaction de dismutation de l'eau oxygénée selon la réaction : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Tout comme la SOD, elle participe également à l'inhibition de l'oxydation des lipides (Dupré-Crochet *et al.*, 2013) (Figure 43).

4.2. Les antioxydants non-enzymatiques

Les enzymes ne sont pas les seuls éléments mis à disposition par la cellule pour contrôler la quantité d'ERO. En effet, il existe diverses molécules antioxydantes, donc réductrices, non enzymatiques telles que les vitamines C et E (respectivement l'acide ascorbique et le tocophérol), les caroténoïdes ou encore les quinones, mais aussi le glutathion (GSH), la cystéine, la cystéamine et la pantéthine (Figure 43). Des protéines chélatrices de métaux ou liant les groupements hémiques, ainsi que certains acides aminés, même s'ils ont de faibles propriétés antioxydantes, participent aussi aux mécanismes de neutralisation des ERO lorsqu'ils sont en quantité suffisante (Delattre *et al.*, 2005).

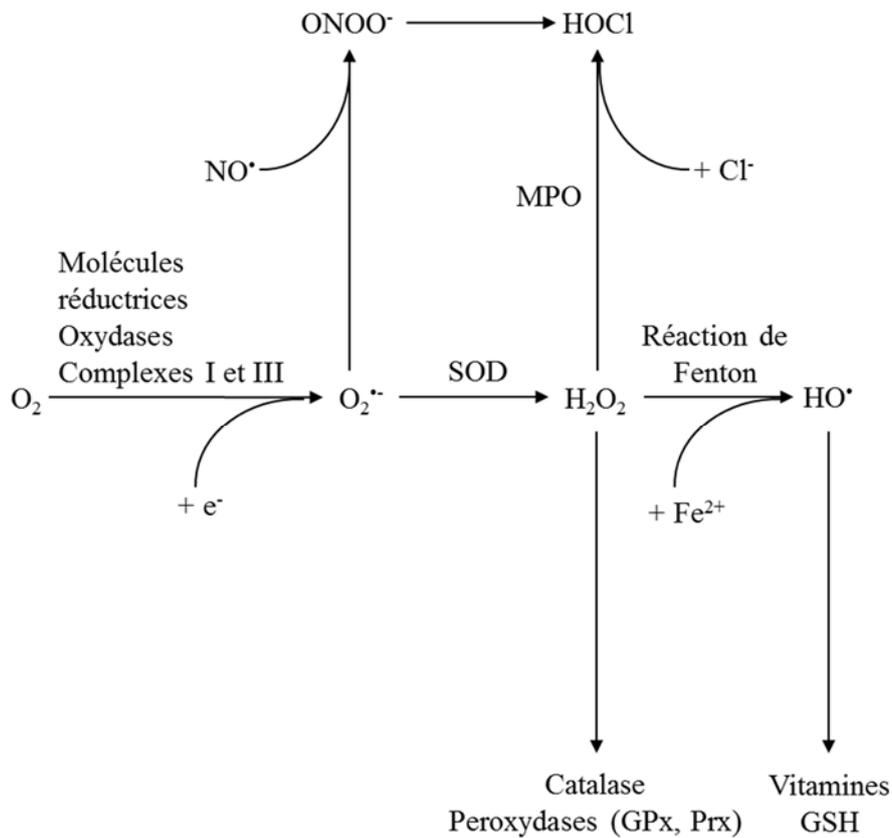


Figure 44. Récapitulatif des voies métaboliques à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L' O_2 est capable de capter un électron, formant le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Ce dernier est catalysé par les superoxydes dismutases (SOD) pour donner de l' H_2O_2 , transformé en radical hydroxyle HO^{\cdot} par la réaction de Fenton. L' HO^{\cdot} est extrêmement réactif et oxyde très rapidement les molécules voisines formant parfois d'autres radicaux libres. L' H_2O_2 peut aussi subir des réactions de détoxication catalysées par la catalase et les peroxydases GPx et Prx. De même, plusieurs composés, notamment les vitamines E et C et le glutathion (GSH), peuvent interagir avec les radicaux et les détoxifier. Le métabolisme de l'oxygène croise celui de l'azote puisque $O_2^{\cdot-}$ peut interagir avec un autre radical, le monoxyde d'azote NO^{\cdot} , conduisant à la production de peroxynitrite ($ONOO^-$), un autre composé toxique. La myéloperoxydase (MPO) permet en présence d'ion Cl^- , la formation d'acide hypochloreux $HOCl$ à partir de l' H_2O_2 (d'après Delattre *et al.*, 2005 ; Barouki, 2006).

Enfin, certains minéraux et oligoéléments ont une action antioxydante, notamment en agissant comme cofacteurs des enzymes antioxydantes (SOD, GPX) ou en participant à la neutralisation des radicaux libres produits par exemple par les cellules de l'immunité.

Ces mécanismes de catabolisme et d'anabolisme des ERO sont récapitulés dans la [Figure 44](#).

4.3. Cas de la N-acétylcystéine

La N-acétylcystéine, ou NAC, est un acide aminé non essentiel dérivant de la cystéine et précurseur du glutathion, principal antioxydant endogène de l'organisme. Grâce au groupement thiol qui le compose et qui est sensible à l'oxydation, la N-acétylcystéine se trouve être une cible préférentielle pour les ERO. Utilisé chez l'Homme comme médicament en tant qu'agent mucolytique, par cassure des ponts disulfures des mucoprotéines (glycoprotéines contenant plus de 10% d'hydrate de carbone), il permet en effet de diminuer l'excédent de mucus encombrant les voies respiratoires en cas de grippe, bronchite ou sinusite ou même de fibrose kystique (mucoviscidose). La N-acétylcystéine est souvent utilisée dans les études portant sur le stress oxydant. Elle peut être administrée à des cellules *in vitro* préalablement exposées à un pro-oxydant comme l' H_2O_2 (Xiao *et al.*, 2014), mais aussi conjointement à l'insecticide fipronil (Ki *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Romero *et al.*, 2016), afin d'évaluer les capacités de la NAC à temporiser les effets pro-oxydants du fipronil. *In vivo*, la NAC a été testée sur des insectes comme la drosophile (Sun *et al.*, 2012) ou les abeilles pour contrebalancer les effets de l'herbicide paraquat (Cousin *et al.*, 2013).

62

4.4. Les systèmes de réparation post-ERO

Lorsque les espèces réactives de l'oxygène échappent aux antioxydants, et provoquent des dégâts sur les protéines, les lipides et l'ADN, la cellule dispose de divers systèmes de réparation ou d'élimination pour limiter les effets délétères. Hormis les systèmes de réparation des dommages causés à l'ADN, les produits de l'oxydation des protéines et des lipides sont éliminés de la cellule.

Concernant les lipides peroxydés, les systèmes protéiques de protection, les phospholipases, vont avant tout stopper la réaction en chaîne se déroulant lors de la lipoperoxydation, et supprimer les parties fortement endommagées afin de permettre la réparation par d'autres systèmes enzymatiques. En effet, les acétyltransférases vont remplacer les acides gras éliminés tandis que la glutathion transférase se charge de la réparation des acides gras oxydés. Les protéines oxydées quant à elles vont être prise en charge par le protéasome qui va les dégrader *in fine* en résidus acides aminés, recyclés pour la formation de nouvelles protéines (Costa *et al.*, 2007). L'ADN oxydé est pris en charge par des exo- et des endonucléases qui vont éliminer les fragments endommagés. Les glycosylases et la

Tableau 8. Systèmes enzymatiques antioxydants prédits dans le génome d'*A. mellifera* et mesure de l'activité de certains d'entre eux lors d'une infection par *N. ceranae*.

Antioxydant prédit (Nikolenko <i>et al.</i> , 2012)	Acronyme	Fonction antioxydante	Activité en présence de <i>N. ceranae</i>
Catalase	CAT	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O	Diminution de l'expression du gène (Aufauvre <i>et al.</i> , 2014) Augmentation de l'expression du gène (Dussaubat <i>et al.</i> , 2012)
Glutathion peroxydase	GPx	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par oxydation du glutathion	Diminution de l'activité (Dussaubat <i>et al.</i> , 2012)
Glutathion peroxydase like	GPx-like		Augmentation de l'expression du gène (Dussaubat <i>et al.</i> , 2012)
Glutathion réductase	GRx	Réduction de la GST	Pas de modification de l'activité (Dussaubat <i>et al.</i> , 2012)
Glutathion-S-transférase	GST	Réduction des xénobiotiques	Augmentation de l'activité (Vidau <i>et al.</i> , 2011a) Augmentation de la quantité (Vidau <i>et al.</i> , 2014)
Méthionine sulfoxyde réductase A et B	Msr	Réduction de la Trx	-
Peroxyrédoxine	Prx	Réduction de l'H ₂ O ₂ en H ₂ O par oxydation de la Prx	-
Superoxydes dismutases mitochondriales (MnSOD) et cytosoliques (Cu/ZnSOD)	SOD	Réduction de l'O ₂ ^{•-} en H ₂ O ₂	Pas de modification de l'activité (Dussaubat <i>et al.</i> , 2012)
Thiorédoxine réductase	TrxR	Réduction de la Prx	Augmentation de la quantité (Vidau <i>et al.</i> , 2014)
Vitellogénine	Vg	Cible préférentielle des ERO, comparativement à d'autres protéines de l'hémolymphe	Diminution de l'expression du gène (Antúñez <i>et al.</i> , 2009 ; Goblirsch <i>et al.</i> , 2013) Augmentation de la quantité chez les reines (Alaux <i>et al.</i> , 2011) Diminution de l'expression du gène corrélée avec l'augmentation de la charge sporale (Antúñez <i>et al.</i> , 2013) Augmentation de l'expression du gène en présence de pollen (Dussaubat <i>et al.</i> , 2013 ; Zengh <i>et al.</i> , 2014)

polymérase vont permettre le remplacement des vides laissés par les précédentes enzymes et enfin les ligases vont pouvoir assembler le tout pour faire la liaison entre les segments réparés.

5. Stress oxydant, abeilles et *Nosema ceranae*

Plusieurs gènes codant pour des systèmes enzymatiques antioxydants sont présents dans le génome de l'abeille (Corona & Robinson, 2006) et sont répertoriés dans le [Tableau 8](#).

Dussaubat et collaborateurs ont mesuré une augmentation de l'expression des gènes codant pour une catalase et une glutathion peroxydase (GPx) chez les abeilles infectées par *Nosema ceranae*, ce qui pourrait traduire une compensation des effets potentiellement négatifs des ERO. Cependant les mêmes auteurs ont montré une diminution de l'activité de la GPx au cours de l'infection (Dussaubat *et al.*, 2012), suggérant des régulations post-traductionnelles ou une inhibition potentielle de son activité par les parasites. Au contraire, l'activité enzymatique de la Glutathion-S-Transférase (GST), autre enzyme à potentiel antioxydant, semble quant à elle augmenter lors d'une infection par *N. ceranae* (Vidau *et al.*, 2011a).

Chez l'abeille, la vitellogénine, une lipoprotéine circulant dans l'hémolymphe, joue un rôle important dans le développement. Cette protéine possède également des propriétés antioxydantes en piégeant les radicaux libres oxygénés, permettant aux ouvrières et à la reine de conserver de bonnes facultés à effectuer leurs différentes tâches jusqu'à la fin de leur vie (Nelson *et al.*, 2007). En effet, Seehuss et collaborateurs ont montré que les abeilles possédant un fort taux d'hormone juvénile (HJ) étaient plus sensibles au stress oxydant. Or chez l'abeille, le taux d'HJ est élevé lorsque celui de la Vg est faible, puisqu'elle inhibe la production de Vg. Chez la drosophile, il a d'ailleurs été montré qu'une augmentation d'HJ, et donc une diminution de la Vg, diminuait la tolérance au stress oxydant. Ainsi, un fort taux de vitellogénine (et donc un faible taux d'HJ) aurait donc un effet positif sur la résistance au stress oxydant. Aussi, les mesures réalisées sur différentes protéines de l'hémolymphe ont montré que la Vg était une cible préférentielle pour la carbonylation, avec environ 10 fois plus de Vg carbonylée comparé à l'apolipoprotéine 1 et l'hexamérine, autres protéines circulantes de l'hémolymphe (Seehuss *et al.*, 2006). En culture *in vitro*, l'équipe d'Havukainen a montré que la Vg extraite d'abeille et mise en contact avec des cellules d'insectes en culture pouvait aider ces dernières à lutter contre les effets négatifs des ERO (Havukainen *et al.*, 2013).

Lors d'une infection par *N. ceranae*, le taux d'HJ semble augmenter et l'expression du gène *vg* diminuer (Antúñez *et al.*, 2009; Goblirsch *et al.*, 2013a). Ainsi, la diminution de la quantité de Vg, protéine cibles des radicaux, pourrait entraîner une augmentation de l'oxydation des cibles cellulaires des ERO (protéines, lipides et ADN).

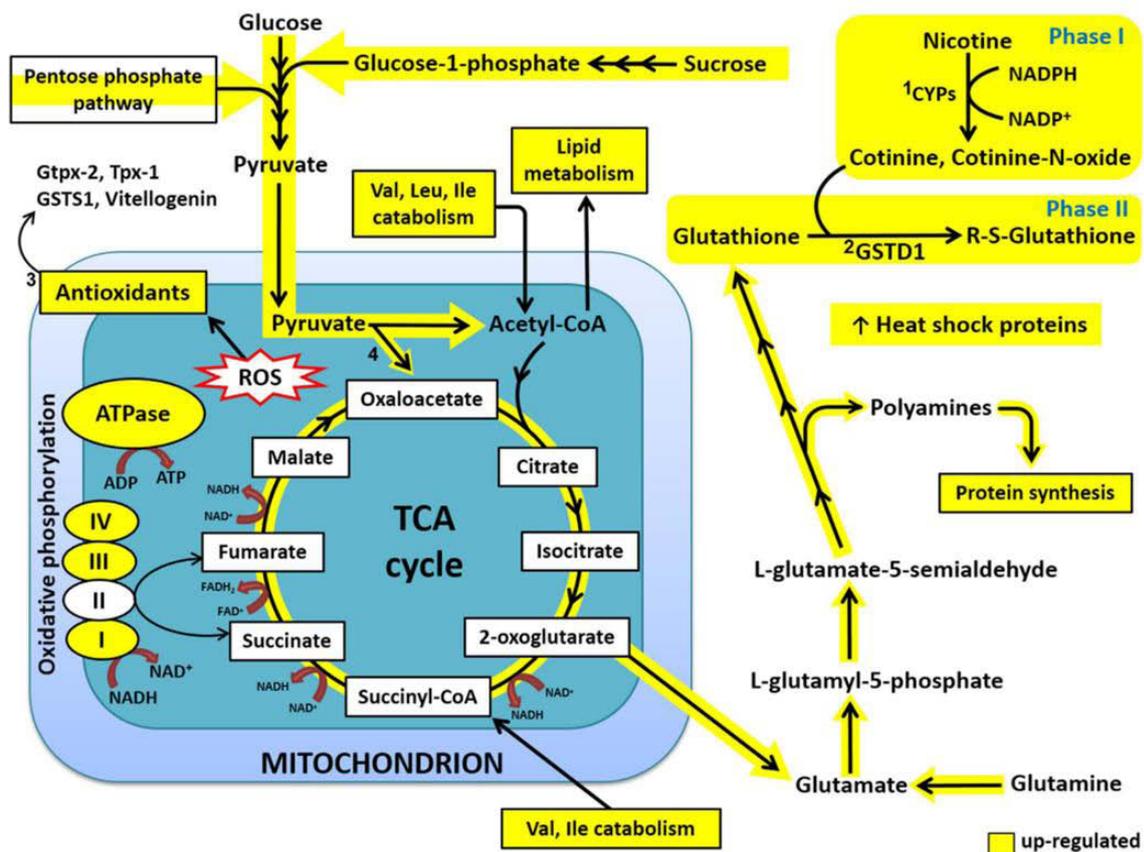


Figure 45. Représentation schématique des mécanismes de détoxification de la nicotine proposés chez l'abeille.

1 : La nicotine, constituant majeur des néonicotinoïdes, est oxydée par les cytochromes P450 mono-oxygénases (CYP) durant la phase I de détoxification. **2 :** Le produit oxydé, la cotinine-N-oxydée, est réduit par une Glutathion-S-Transférase (GST-D1) lors de la phase II. Cette détoxification en réponse au stress nécessite de l'énergie fournie par le cycle de Krebs (TCA cycle). L'augmentation du métabolisme mitochondrial durant la détoxification engendre une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Ceci favorise une augmentation de l'expression des gènes codant pour certains antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques : Glutathion peroxydases (Gtpx-2), Glutathion-S-Transférase (GST-S1), Peroxyrédoxine (TPx-1), ainsi que la Vitellogénine (**3**). L'augmentation de l'activité du cycle de Krebs fournit des précurseurs tels que le glutamate, afin de soutenir la synthèse accrue du glutathion, cofacteur de la GST. Le maintien de l'activité du cycle de Krebs est permis grâce à la réaction anapérotrique de conversion du pyruvate en oxaloacétate, catalysée par la pyruvate carboxylase (**4**). L'augmentation du catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée répond à la demande accrue en acétyl-CoA du cycle de Krebs et du métabolisme lipidique observé (d'après Rand *et al.*, 2015).

Dans le contexte actuel où les abeilles sont exposées à de multiples facteurs de stress, biotiques et/ou abiotiques, la capacité de comprendre comment ces organismes peuvent résister devient crucial afin de permettre de modifier nos comportements et trouver des moyens pour protéger les abeilles. La capacité de l'abeille à détoxiquer les molécules comme les xénobiotiques ou les molécules endogènes pro-oxydantes, dérivant ou non de la métabolisation de ces toxiques, doit notamment être mieux décrite.

Récemment, Rand et collaborateurs ont étudié les mécanismes de détoxification chez des abeilles exposées à la nicotine, molécule dont dérivent les pesticides de la famille des néonicotinoïdes. Ils ont notamment constaté une augmentation des gènes impliqués dans le métabolisme du glutathion ainsi que des antioxydants correspondants (GST, GTPx, TPx), traduisant une augmentation du stress oxydant (Rand *et al.*, 2015) (Figure 45).



Chapitre 2 : Effet conjoint de *Nosema ceranae* et du fipronil sur la balance oxydante de l'intestin de l'abeille domestique

*« La connaissance s'acquiert par l'expérience,
tout le reste n'est que de l'information. »*

Albert Einstein

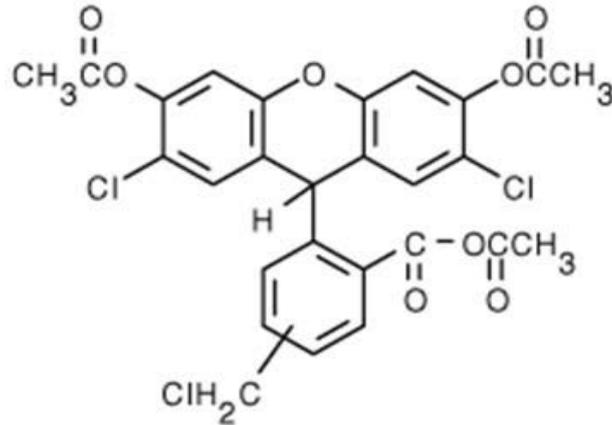


Figure 46. Sonde fluorescente moléculaire CM-H₂DCFDA. Le groupement chlorométhyle (CH₂Cl) permet la fixation sur les groupements thiols (-SH) des constituants du contenu cellulaire et piège ainsi la sonde dans la cellule. Les groupements acétates (CH₃COO-R) de la sonde sont ensuite clivés par des estérases intracellulaires. L'oxydation subséquente de la sonde, induite par différentes espèces réactives telles que le peroxyde (H₂O₂), le radical hydroxyle (HO[•]), les radicaux peroxydes (ROO[•]) ou l'anion peroxydinitrite (ONOO⁻) conduit à la formation d'un produit fluorescent stable dans le temps, facilitant ainsi son observation en microscopie (d'après Lü *et al.*, 2009).

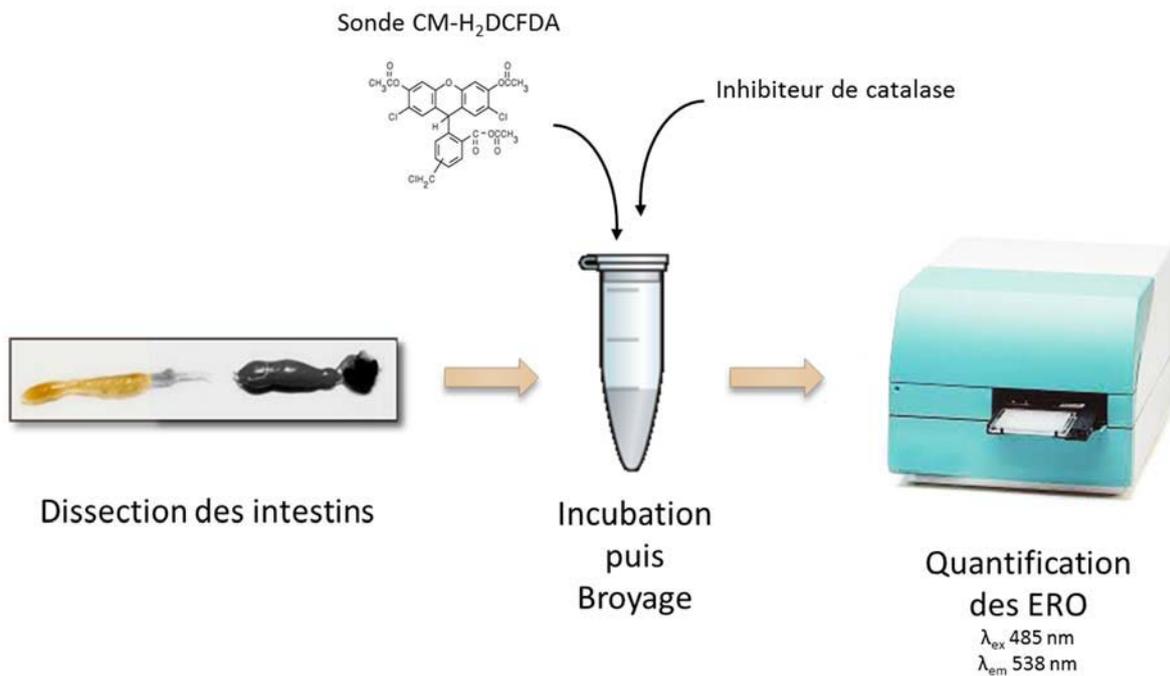


Figure 47. Protocole de mesure des espèces réactives de l'oxygène sur intestins d'abeilles. Après dissection, les intestins sont incubés pendant 20 minutes à l'obscurité dans une solution contenant la sonde CM-H₂DCFDA et de l'inhibiteur de catalase (aminotriazole). Après broyage, les échantillons sont déposés en quadruplicat dans une plaque 96 puits et la fluorescence est ensuite quantifiée (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 538 nm). La mesure a été réalisée sur des intestins d'abeilles infectées ou non par *N. ceranae*, sur un total d'environ 200 échantillons.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai cherché à comprendre lors d'une co-exposition au parasite *Nosema ceranae* et au pesticide fipronil quelles étaient les conséquences sur la balance oxydante de l'intestin de l'abeille.

Les études menées jusque-là sur le stress oxydant chez l'abeille ont été abordées, soit d'un point de vue biochimique par la mesure de l'activité des systèmes antioxydants (Vidau *et al.*, 2011a; Dussaubat *et al.*, 2012), soit d'un point de vue transcriptomique en analysant l'expression des gènes codant différentes enzymes antioxydantes (Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). Ces études se basent sur le principe selon lequel une augmentation de l'activité enzymatique des molécules antioxydantes et/ou de l'expression de leurs gènes reflète(nt) une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Il serait donc envisageable d'utiliser une autre approche plus directe pour étudier le stress oxydant en identifiant et en quantifiant les ERO produites. Cependant, la détection des ERO est relativement difficile puisque ces dernières, très réactives, ont une durée de vie très courte, allant de quelques nanosecondes à quelques secondes. De ce fait, la compréhension de la signalisation complexe des ERO réside dans la capacité à suivre leur dynamique au niveau local et global (c'est-à-dire leur capacité de diffusion à l'intérieur et/ou à l'extérieur de la cellule), mais aussi leur comportement oxydatif et leur évolution dans le temps, au moyen de mesures sensibles, sélectives, et spatiotemporelles (Wang *et al.*, 2013). Les mesures réalisées à l'heure actuelle se font donc généralement sur le système antioxydant, par mesure de l'activité ou de l'expression des gènes, ou sur les dommages causés par les ERO, en quantifiant l'oxydation des acides aminés, des acides nucléiques et des lipides (Kohen & Nyska, 2002).

Ainsi, lors de mes travaux de thèse, l'analyse du stress oxydant n'a pas été menée en dosant des activités enzymatiques du système antioxydant, ni en suivant le niveau d'expression des gènes impliqués, mais en mesurant directement la production d'ERO et les dommages induits dans les cellules intestinales. J'ai donc choisi d'effectuer une mesure globale des ERO, mais aussi des peroxydes solubles (*i.e.* H₂O₂), plus stables dans le temps, ainsi qu'une mesure de l'impact des ERO sur différentes cibles cellulaires, notamment les lipides et les protéines. Ces approches n'ayant jamais été développées sur abeilles, j'ai dû mettre au point et adapter certains protocoles à mon modèle d'étude.

Dans un premier temps, afin de mener à bien la quantification des ERO dans l'intestin des abeilles, j'ai mis en place une méthode utilisant une sonde fluorescente, la sonde CM-H₂DCFDA (Figure 46). Cette sonde est couramment utilisée pour détecter les ERO dans les cellules les tissus. Elle permet par exemple de suivre le devenir des ERO par cytométrie en flux, d'effectuer des observations en microscopie à épifluorescence, ou encore de suivre l'apoptose des cellules. La sonde CM-H₂DCFDA

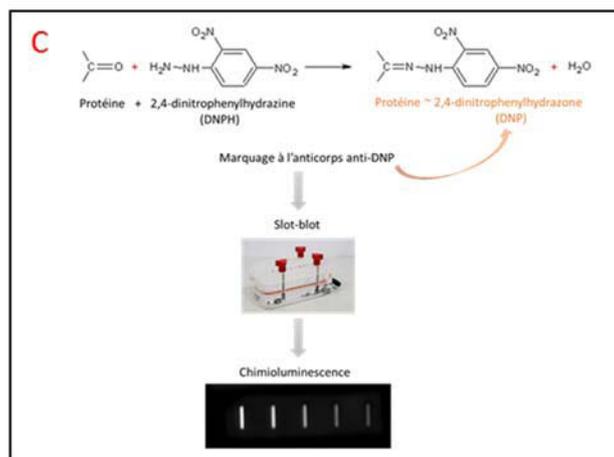
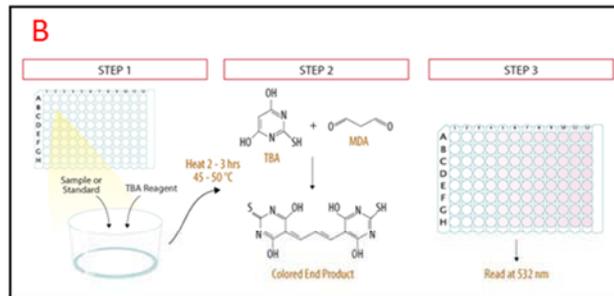
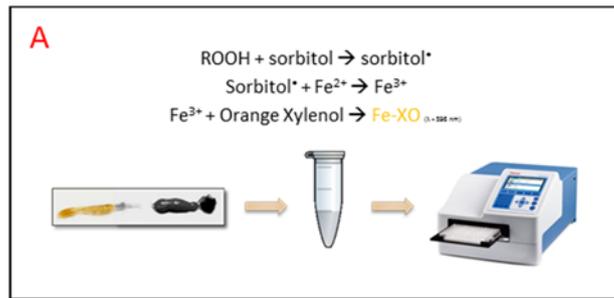


Figure 48. Protocoles expérimentaux développés pour la mesure du stress oxydant de l'intestin de l'abeille. (A) Le test de FOX a été adapté pour la mesure des peroxydes solubles de l'intestin, selon la réaction chimique décrite. Les intestins sont broyés individuellement et incubés dans de l'inhibiteur de catalase (aminotriazole). Les échantillons sont déposés en quadruplet sur des plaques 96 puits en présence du réactif de FOX et la coloration est quantifiée à $\lambda_{596 \text{ nm}}$. (B) La peroxydation des lipides est quant à elle mesurée en utilisant le kit TBARS (Cayman). Celui-ci consiste à quantifier le malondialdéhyde (MDA), un lipide oxydé présent dans l'échantillon. Les intestins ont été broyés par pool de 5 intestins. Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former le complexe MDA-TBA quantifiable à $\lambda_{540 \text{ nm}}$. (C) La quantification de la carbonylation des protéines nécessite une extraction puis une quantification des protéines totales des échantillons. Les intestins sont ainsi broyés dans du tampon d'extraction contenant un inhibiteur de protéase (fluorure de phénylméthylsulfonyl, PMSF). Après une quantification des protéines totales par la méthode de Bradford, les protéines oxydées sont dites dérivées : les protéines sont dénaturées au SDS, puis les échantillons sont incubés en présence de DNPH qui se fixe spécifiquement sur les groupements carbonyle des protéines oxydées, c'est la dérivation. Les protéines-DNP sont ensuite marquées à l'aide d'un anticorps anti-DNP, puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (horseradish peroxidase, HRP), avant d'être transférées par Slot-blot sur une membrane en PVDF. La révélation se fait par une réaction de chimiluminescence et les signaux sont quantifiés et comparés à une gamme de BSA oxydée. Au total, environ 1 000 échantillons ont été analysés pour la mesure des peroxydes solubles, 380 pour la peroxydation des lipides et 570 pour la carbonylation des protéines.

diffuse passivement dans les cellules où ses groupements acétates ($\text{CH}_3\text{COO-R}$) sont clivés par des estérases intracellulaires. Son groupe chlorométhyle (CH_2Cl) réagit avec les groupements thiols ($-\text{SH}$) présents sur les protéines de la cellule, permettant de fixer et stabiliser la sonde. L'oxydation subséquente de la sonde induite par différentes espèces réactives telles que le peroxyde (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO^\bullet), les radicaux peroxydes (ROO^\bullet) ou l'anion peroxydite (ONOO^-), donne alors un produit fluorescent stable dans le temps qui est piégé à l'intérieur de la cellule, facilitant les observations.

Au laboratoire, le Dr. Marie Diogon avait précédemment utilisé cette sonde sur des intestins d'abeilles infectées ou non par *N. ceranae*. Les observations au microscope à épifluorescence semblaient montrer une augmentation de la fluorescence dans l'intestin des abeilles infectées. Cependant, cette technique d'analyse, de par l'impossibilité à quantifier d'une différence de fluorescence entre deux échantillons, restait toutefois peu discriminante.

J'ai ainsi développé un protocole permettant de quantifier cette sonde pour évaluer le stress oxydant dans le tissu intestinal des abeilles infectées ou non par *N. ceranae*. Ce protocole (Figure 47) est décrit dans l'expérience n°1 de la publication suivante.

La quantification des peroxydes solubles, quant à elle, a été adaptée d'une méthode de colorimétrie nommée « test de FOX ». Dans cette méthode, dans un premier temps, à pH acide les peroxydes réagissent avec du sorbitol, le convertissant en radical libre qui, en retour, oxyde le fer et convertit les ions ferreux Fe^{2+} en ions ferriques Fe^{3+} . Dans un second temps, le Fe^{3+} se complexe avec l'orange de xylénol (indicateur coloré) en présence d'acide sulfurique pour former un complexe rouge/violet dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de peroxydes initiaux (Figure 48.A).

Concernant les cibles cellulaires des ERO, j'ai mesuré à la fois les lipides et les protéines oxydés. La mesure des lipides oxydés a nécessité l'utilisation d'un kit disponible sur le marché et classiquement utilisé dans les analyses de stress oxydant. Il permet la détection et la quantification d'un type de lipides oxydés, le malondialdéhyde (MDA), considéré comme représentatif de l'ensemble des lipides endommagés. Le kit ayant déjà été validé sur de nombreux types d'échantillons (plasma, sérum, urine, cellules lysées, broyats tissulaires), aucune adaptation particulière n'a été nécessaire pour l'utilisation sur des broyats d'intestins d'abeilles (Figure 48.B).

A contrario, la mesure des protéines oxydées, et en particulier des groupements carbonyles ($>\text{C}=\text{O}$), a nécessité quant à elle plusieurs mises au point. Le but est de marquer ces groupements avec un anticorps pour pouvoir ensuite les quantifier grâce à un anticorps secondaire. Le principe repose sur la mise en contact des protéines avec du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) qui réagit avec les groupes carbonyles pour former du 2,4-dinitrophényl (DNP). C'est ce groupement qui est marqué par l'anticorps anti-DNP. L'originalité de la méthode choisie pour mon étude par rapport aux protocoles

disponibles dans la bibliographie, réside sur l'utilisation d'une méthode d'immunoblotting de type « slot blot » plutôt qu'une méthode de western blot, permettant ainsi en un seul point de rendre compte de l'ensemble des protéines carbonylées (Figure 48.C). Elle permet également de supprimer l'étape de migration des protéines en SDS-PAGE, classiquement réalisée, et ainsi de limiter les biais de quantification de l'ensemble des protéines carbonylées.

Les trois méthodes, décrites ci-dessus ont donc été utilisées sur les intestins des abeilles infectées par *N. ceranae* et/ou intoxiquées au fipronil. De plus, nous avons choisi de comparer l'effet du fipronil à celui d'un antioxydant couramment utilisé dans les études de stress oxydant en culture cellulaire (Ki *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012), ou de toxicologie sur abeilles (Cousin *et al.*, 2013), la N-acétylcystéine. C'est un précurseur du glutathion qui peut également être oxydé par les ERO et participer ainsi au maintien de l'équilibre de la balance pro-/antioxydants. Ainsi, l'ensemble de ces expérimentations est présenté dans l'expérience n°2 de la publication présentée ci-après.

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

Laurianne Paris,¹ Michaël Roussel,¹ Bruno Pereira,² Frédéric Delbac¹ and Marie Diogon^{1,*†}

¹Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

²Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, Unité de Biostatistiques, DRCI, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

Summary

The causes underlying the increased mortality of honeybee colonies remain unclear and may involve multiple stressors acting together, including both pathogens and pesticides. Previous studies suggested that infection by the gut parasite *Nosema ceranae* combined with chronic exposure to sublethal doses of the insecticide fipronil generated an increase in oxidative stress in the midgut of honeybees. To explore the impact of these two stressors on oxidative balance, we experimentally infected bees with *N. ceranae* and/or chronically exposed to fipronil at low doses for 22 days, and we measured soluble reactive oxygen species (ROS) and ROS damage by quantifying both protein and lipid oxidation in the midgut. Our results revealed a disruption of the oxidative balance, with a decrease in both the amount of ROS and ROS damage in the presence of the parasite alone. However, protein oxidation was significantly increased in the *N. ceranae*/fipronil combination, revealing an increase in oxidative

damage and suggesting higher fipronil toxicity in infected bees. Furthermore, our results highlighted a temporal order in the appearance of oxidation events in the intestinal cells and revealed that all samples tended to undergo protein oxidation during ageing, regardless of treatment.

Introduction

Honeybees play a preponderant role in crop pollination and biodiversity conservation. Unfortunately, massive mortalities of managed honeybee populations have been reported for many years, especially in Europe and North America. For instance, the number of *Apis mellifera* colonies decreased from 4.6 million in 1970 to 2.7 million in 2014 in the USA and from 21.1 million to 17.7 million in the same time in Europe (FAO, 2017), and the colony losses reached 32.4% in some apiaries in Belgium at the end of winter 2013 (Laurent *et al.*, 2016). The origin of colony losses is considered multicausal, including pathogens and predators, chemical substances (pesticides, industrial pollutants), agricultural practices and climatic conditions, but no identified individual cause is sufficient to explain the global honeybee decline recorded worldwide. This led to the consideration that interactions between multiple stressors, in particular between parasites and pesticides, might play a role in colony decline (VanEngelsdorp *et al.*, 2009; Neumann and Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010; VanEngelsdorp and Meixner, 2010; Cousin *et al.*, 2013; Nazzi and Pennacchio, 2014; Goulson *et al.*, 2015). Indeed, honeybee colonies are exposed through their foraging activities to a variety of chemical pollutants and pathogens, and several studies have demonstrated detrimental interactions between these stressors. Most of these studies focused on the gut parasite *Nosema ceranae*, indicating that this infectious agent can sensitize honeybees to chemical stressors (Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014; Pettis *et al.*, 2012, 2013; Wu *et al.*, 2012; Retschnig *et al.*, 2014). Moreover, the association of stressors may have a synergistic effect, i.e. their combined

Received 6 March, 2017; accepted 14 June, 2017.

*For correspondence. E-mail marie.diogon@uca.fr; Tel. (+33) 4 73 40 53 06; Fax (+33) 4 73 40 76 70.

†Present address: Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, 1 Impasse Amélie Murat – TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France.

Microbial Biotechnology (2017) 0(0), 000–000
doi:10.1111/1751-7915.12772

Funding Information

This work was funded by a grant from the French Agence Nationale de la Recherche (BEELOSS programme, grant number ANR-12-BSV3-0020). LP was supported by grants from the 'Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

© 2017 The Authors. *Microbial Biotechnology* published by John Wiley & Sons Ltd and Society for Applied Microbiology.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

effect may be stronger than the sum of their effects taken independently (Holmstrup *et al.*, 2010).

The microsporidium *Nosema ceranae* is among the most common pathogen in *Apis mellifera*, with a worldwide distribution (Goulson *et al.*, 2015). This obligate intracellular parasite invades and develops within the cytoplasm of the epithelial cells of the adult honeybee midgut and has been associated with the weakening of honeybee colonies (Higes *et al.*, 2006; Fries, 2010). Honeybees become infected when they ingest *Nosema* spores, the faecal–oral and oral–oral (exchange by trophallaxis) routes of transmission being the main modes of transmission (Higes *et al.*, 2010; Smith, 2012). Fipronil is an insecticide in the phenylpyrazole family that acts as a reversible inhibitor of the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor and glutamate-activated chloride channels. It is widely used for control of arthropods and especially lepidopteran pests, in the form of dispersible granules, concentrated aqueous solutions or seed coating, on worldwide crops pollinated by bees.

Both *Nosema ceranae* and fipronil may alter the behaviour, the physiology and the survival of honeybees at different levels. At the social level, these stressors may induce many changes in the colony organization (Antúnez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013) and may disturb foraging activities by reducing homing and orientation abilities (Colin *et al.*, 2004; Mayack and Naug, 2010; Decourtye *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2013). At the individual level, fipronil induces impaired learning and memory (Decourtye *et al.*, 2005; El Hassani *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009; Bernadou *et al.*, 2009), while *N. ceranae* can cause severe nutritional and energetic stress (Mayack and Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012) and a progressive and irreversible degeneration of the gut epithelium that can lead to disorders of digestive function (García-palencia *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2012). At the cellular level, infection by *N. ceranae* results in a significant decrease in the rates of host energetic resources such as ATP and carbohydrates (Higes *et al.*, 2007; Williams, 2009; Mayack and Naug, 2010; Aliferis *et al.*, 2012) and may also prevent apoptosis in epithelial cells of the infected midgut (Higes *et al.*, 2013; Kurze *et al.*, 2015; Martín-Hernández *et al.*, 2017). Finally, both *N. ceranae* and fipronil can affect the humoral response by decreasing the expression of antimicrobial peptide-encoding genes (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). Interestingly, different studies have also shown that the combination of *N. ceranae* and sublethal doses of fipronil led to a significant decrease in honeybee survival (Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014).

Reactive oxygen species (ROS) are a key component of the innate immune response in insects. In *Drosophila*

melanogaster, ROS-mediated immunity was shown to be particularly important to fight pathogens in the midgut (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Buchon *et al.*, 2014). These reactive molecules and free radicals derived from molecular oxygen are permanently generated by different physiological mechanisms at low-to-moderate concentrations as signalling mediators or defensive molecules, or during mitochondrial respiration. They can also be generated from exogenous sources such as food, pollutants or toxins (Batty *et al.*, 2009; Bevilacqua *et al.*, 2012; Dupré-Crochet *et al.*, 2013; Nathan and Cunningham-Bussel, 2013). In contrast, when they are produced at high concentrations, they can damage numerous components of the cell including lipids, proteins and DNA (Kohen and Nyska, 2002). Fortunately, most organisms possess antioxidant systems to control and regulate the level of ROS (Delattre *et al.*, 2005; Dupré-Crochet *et al.*, 2013). Consequently, in physiological conditions, the antioxidant/pro-oxidant balance is in equilibrium, but in some cases, an excess of ROS can occur, either by antioxidant deficit or because of overproduction of radicals. This imbalance is referred to as oxidative stress (Delattre *et al.*, 2005). Oxidative stress is transient and generally tissue specific. One methodology for determination of oxidative stress consists of direct detection of ROS and other radicals, but this remains rather difficult because these molecules are very short-lived and highly reactive. Thus, oxidative stress may be measured through quantification of oxidative damage markers (lipid, protein and DNA oxidation) or quantification of the antioxidant defence system (Kohen and Nyska, 2002).

The honeybee genome revealed a specific lack of several genes involved in innate immunity and detoxification enzymes compared with the genomes of *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae* (Claudianos *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2006; du Rand *et al.*, 2015). This deficit in genes involved in both detoxification and immunity processes is compensated for by the eusocial organization of bee colonies (Nikolenko *et al.*, 2012). However, many transcriptomic studies showed that the expression of different genes involved in the antioxidant system was significantly increased in the bee midgut during infection with *N. ceranae* (Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). This parasite also induced changes in the gut in both the quantity and the activity of different ROS-scavenging enzymes (Vidau *et al.*, 2011, 2014; Dussaubat *et al.*, 2012). All these data suggest an increase in the production and enzymatic activity of components of the antioxidant system in response to eventual ROS production during infection by *N. ceranae*.

In the present study, our objective was to determine whether exposure to the insecticide fipronil and/or infection by *Nosema ceranae* may disturb the pro-oxidative/antioxidative balance in the honeybee midgut, which is the target

tissue of both *N. ceranae* development and fipronil absorption. In addition, we chose to compare the assumptive pro-oxidant effect of fipronil (Ki *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013) to the effect of N-acetylcysteine, an antioxidant commonly used in oxidative stress studies (Ki *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Cousin *et al.*, 2013). We directly measured ROS compounds and developed techniques to quantify cell damage in honeybee intestinal cells. A primary experiment was performed to quantify the amount of ROS in the midgut of infected honeybees. A secondary experiment was then conducted to measure peroxide production and cell damage (protein and lipid oxidation) in the midgut of *Nosema*-infected and/or fipronil-intoxicated bees.

Results

Experiment 1: ROS measurement in the midgut of *Nosema ceranae*-infected versus uninfected honeybees

To evaluate the global oxidative status of the *Apis mellifera* midgut upon infection by *Nosema ceranae*, a ROS-sensitive fluorescent probe (CM-H₂DCFDA) was used to detect and quantify reactive oxygen species (ROS) in both uninfected and infected bees at different hours (H) or days (D) post-infection, from D0 to D17. Statistical analyses did not show any difference between control (i.e. uninfected) and infected honeybees except on 2 days, D2 ($P = 0.043$) and D17 ($P = 0.001$). On those days, the amount of ROS significantly decreased in infected bee midguts compared with those of the control group (Fig. 1).

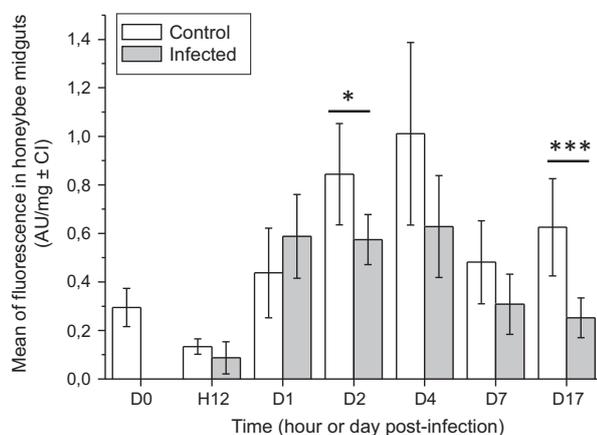


Fig. 1. Comparison of ROS concentration between *Nosema ceranae*-infected and uninfected honeybees. The ROS concentration was measured in uninfected (control) and infected honeybee midguts using the ROS-sensitive CM-H₂DCFDA fluorescent probe from D0 (time of infection, 5 days after emergence of bees) to D17. The fluorescence was calculated by deducting the natural fluorescence (mean fluorescence of midgut incubated with the probe subtracted from mean fluorescence of midgut unincubated with the probe) from the total fluorescence. Asterisks indicate significant differences between control and infected groups, calculated with a Mann–Whitney *U*-test (* $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$).

Experiment 2: analysis of the oxidative balance in honeybee midguts following infection by *Nosema ceranae* and/or exposure to the insecticide fipronil, or the N-acetylcysteine antioxidant

In this experiment, six experimental groups were created: (i) untreated control (Control), (ii) infected with *N. ceranae* (Infected), (iii) uninfected and fed with 1 mM of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC), (iv) infected and fed with N-acetylcysteine (INAC), (v) uninfected and chronically exposed to 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of fipronil (FIP) and (vi) infected and chronically exposed to fipronil (IFIP). Each group was monitored daily (from D0 to D22) to evaluate their survival rate and consumption behaviour. To further analyse the oxidative balance, honeybee midguts were collected to track the production of soluble peroxides as well as the damage potentially generated by ROS (oxidation of lipids and proteins).

Survival analysis and consumption behaviour

Survival analysis indicated that untreated bees (Control) and bees fed with the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) had the lowest mortality rate (< 20%) at the end of the experiment, i.e. D22 (Fig. 2). In contrast, when bees were chronically exposed to the insecticide fipronil (FIP), the mortality rate significantly increased and reached approximately 40% at D22 ($P < 0.001$). All three *N. ceranae*-infected groups (Infected, INAC and IFIP) also showed a significant decrease in bee survival ($P < 0.001$) compared with their uninfected counterparts (Control versus Infected; NAC versus INAC; FIP versus IFIP; $P < 0.001$), but there was no significant difference in the survival probability among the three infected groups (see Table S1).

The monitoring of daily sucrose consumption revealed a sudden drop in consumption (fold change of approximately 1.8 ± 0.5) during the 4 days after anaesthesia with CO₂ in all six experimental groups (Fig. 3). Mixed model statistical analysis (Table S1) of daily consumption indicated a similar consumption profile for bees exposed to NAC (NAC), to *N. ceranae* (Infected) and to the *N. ceranae*–fipronil combination (IFIP) compared with the control group. In contrast, the daily sucrose consumption stopped increasing for groups exposed to fipronil alone (FIP) and to the *N. ceranae*–NAC combination (INAC) from days D5 and D7, respectively, and the mean stabilized at 30 ± 5 and 35 ± 5 mg bee⁻¹ day⁻¹ respectively. For all combined days, the comparison among the six groups highlighted a different level of consumption for the fipronil-exposed (FIP) group, with a 1.14-fold decrease in sucrose consumption compared with the control group ($P < 0.001$). Fipronil-exposed honeybees absorbed an average of 0.013 ng of fipronil per bee per day; similarly,

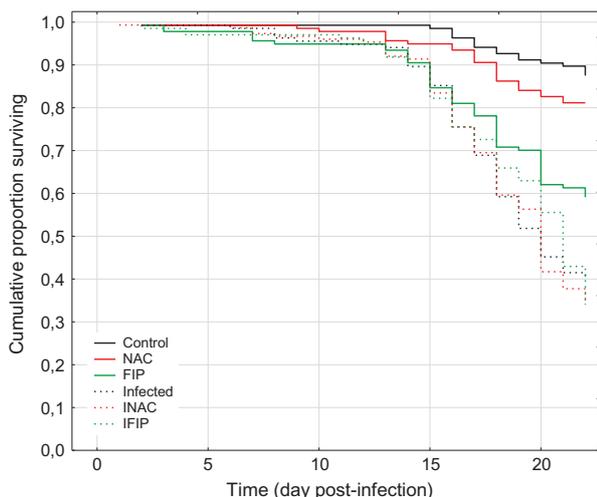


Fig. 2. Survival analysis of honeybees after infection by *Nosema ceranae* and/or exposure to the insecticide fipronil or to the antioxidant N-acetylcysteine.

The data show the cumulative proportion of surviving honeybees exposed to no treatment (Control), to *N. ceranae* (Infected), to fipronil $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ (FIP), to N-acetylcysteine 1 mM (NAC), to *N. ceranae*–fipronil combination (IFIP) or to a combination of *N. ceranae* and NAC (INAC). The data from three replicates of 45 bees for each experimental condition were analysed with the Kaplan–Meier method and the Cox–Mantel test (see Table S1). D0 corresponded to the day of honeybee infection, 5 days after their emergence.

bees co-exposed to *N. ceranae* and fipronil (IFIP) consumed an average of $0.014 \text{ ng bee}^{-1} \text{ day}^{-1}$. The oral LD_{50} of fipronil is 4.2 ng bee^{-1} , and thus, we determined that the bees surviving at the end of experiment (D22) had received $1/14.6$ and $1/13.5$ of the LD_{50} for the FIP and IFIP groups respectively. It can also be noted that similar quantities of the antioxidant had been ingested by uninfected (NAC, $5.2 \mu\text{g bee}^{-1} \text{ day}^{-1}$) and infected (INAC, $5.3 \mu\text{g bee}^{-1} \text{ day}^{-1}$) bees (see Table S1).

Nosema ceranae development

The success of *N. ceranae* infection was monitored by counting the spores present in the whole bee digestive tract at 7, 14 and 22 days post-infection. No significant difference was observed among the three infected groups (Infected, INAC and IFIP; Fig. 4). The absence of *N. ceranae* in the control groups was confirmed by examining the contents of the abdomens by microscopy.

Quantification of soluble peroxides, lipid peroxidation and protein carbonylation in honeybee midguts

To evaluate the oxidative status of midguts under infection by *N. ceranae* and/or exposure to fipronil or N-acetylcysteine, we quantified the amount of soluble peroxides and measured oxidative damage by

quantifying both lipid peroxidation and protein carbonylation.

Determination of oxidative events. Principal component analysis (PCA) revealed relationships between three initial variables, underlying an opposite relation between oxidized lipids and oxidized proteins (Fig. 5). Furthermore, inertia of soluble peroxide points was shared between two dimensions and, consequently, between oxidized lipids and proteins. The correlation between oxidized lipids and soluble peroxides was not significant. Figure 5 depicts a timeline of the appearance of experimental effects on oxidative balance, considering the barycentre of all the conditions for each day observed. Indeed, it seemed that lipids underwent oxidation over time before an increase of soluble peroxides in the midgut. Then, at D14, all samples tended towards protein oxidation. We also noted that the samples were well grouped at D0 (just before infection). Between H5 and D7, the sample points of the PCA seemed more scattered, reflecting different behaviour of samples depending on treatments, but they were all gathered at D14 and tended towards protein carbonylation.

Oxidative damages and soluble peroxide production. Mixed model analysis was used individually for the three experiments (soluble peroxides, lipid peroxidation and protein carbonylation). Concerning the lipid peroxidation, no significant difference was observed among all groups compared with the untreated group (Control) when we considered all combined days (Fig. 6A). Nonetheless, we observed a global slight increase in lipid oxidation in the fipronil-treated group (FIP) compared with the control group and a downward trend in the three infected groups (Infected, INAC and IFIP). In the infection–fipronil combination (IFIP), we observed a 1.2-fold decrease in lipid oxidation compared with bees only exposed to fipronil (FIP; Fig. 6A). Figure 6B shows the kinetic of lipid peroxidation and highlights an important decrease in lipid oxidation for each group at D14. At this time, the average concentration of oxidized lipids was $4.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ in the three uninfected groups (Control, NAC and FIP), while it was only $2.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ in the three infected groups (Infected, INAC and IFIP). These differences were statistically confirmed (see Table S3). Interestingly, this decrease occurred earlier (from the 4th day post-infection) in both the INAC and IFIP groups compared with the other groups. However, in contrast to the next experimental measures (protein carbonylation and soluble peroxide quantification), the lipid peroxidation could not be determined at D22 due to the low bee survival on this day.

We also measured the amount of soluble peroxides at eight time points from D0 to D22. Statistical analyses

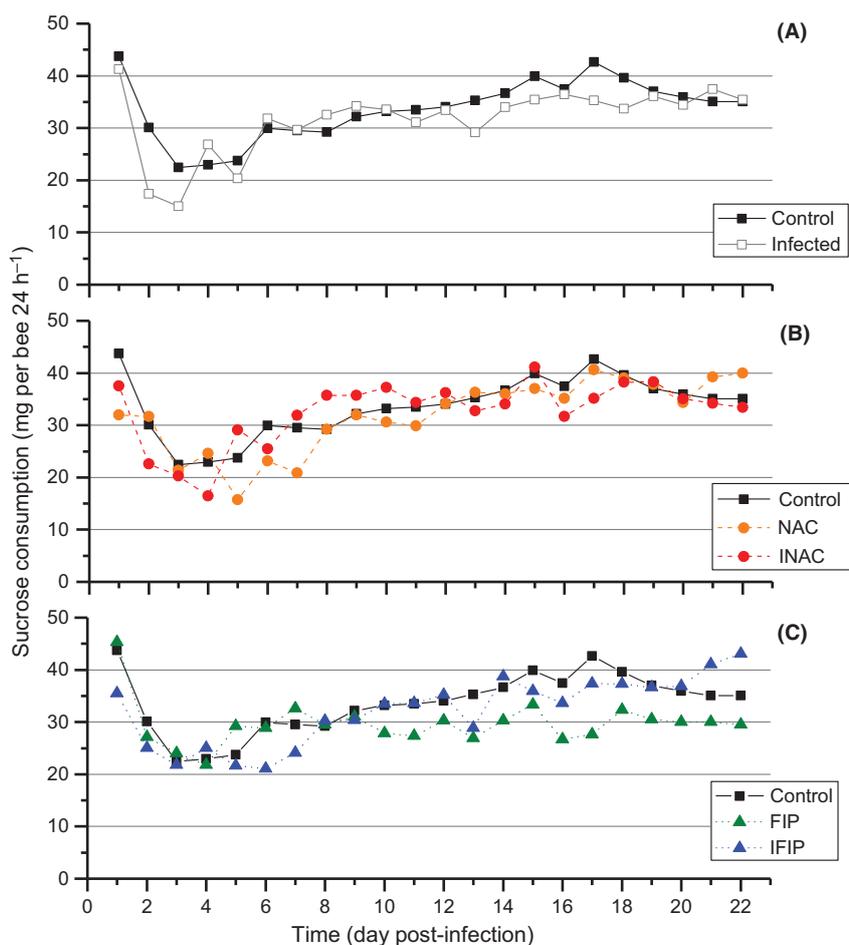


Fig. 3. Daily sucrose consumption curves of honeybees for the six experimental groups.

The data represent the mean sucrose consumption for three cages per condition (mg per bee per 24 h) monitored daily from D0 to D22 in the three uninfected groups (Control, NAC, FIP) and the three infected groups (Infected, INAC, IFIP). The quantity of sucrose consumed was measured daily by weighing the feed tubes. A mixed model analysis was performed to compare dietary behaviour in the six different conditions (see Table S1). The control was compared to the infected group (A), NAC and INAC groups (B) and FIP and IFIP groups (C). D0 corresponded to the day of honeybee infection, 5 days after their emergence.

showed that the antioxidant treatment (NAC) led to a global increase in soluble peroxides in midguts compared with untreated bees (Control). In contrast, the cumulative concentration of soluble peroxides was significantly reduced in the three infected groups (Infected, INAC and IFIP) compared with the control group and was lowered compared with their respective controls (Control versus Infected; NAC versus INAC; FIP versus IFIP; $P < 0.01$; Fig. 7A and Table S2). Figure 7B revealed the kinetics of soluble peroxide production between the different groups with reference to the control group. We could observe in the control group a production peak at $1.54 \text{ nmol mg}^{-1}$ on D1, followed by stable production of approximately $1.05 \pm 0.11 \text{ nmol}$ of peroxides per mg of midgut between D2 and D22. In uninfected bees exposed to the antioxidant (NAC), this peak of soluble peroxides appeared earlier, at H5

($1.49 \text{ nmol mg}^{-1}$), and the concentration remained stable from D2 to D22 ($1.32 \pm 0.07 \text{ nmol mg}^{-1}$) but was 1.3-fold higher than that found in the untreated control. Bees only exposed to fipronil (FIP) presented less regular kinetics compared with the control group, but no difference could be observed when all combined days were considered (see Fig. 7A). The *N. ceranae*-infected group (Infected) presented the same kinetics as the control group except for a significant decrease at D7, similar to what was observed in the INAC group, at approximately $0.50 \pm 0.07 \text{ nmol mg}^{-1}$ after a previous peak at D4. Contrary to other groups, the INAC group was relatively stable during the two-first days post-infection (mean of $0.96 \pm 0.05 \text{ nmol mg}^{-1}$ from D0 to D2). Finally, the group of bees exposed to the *N. ceranae*-fipronil combination (IFIP) presented unique kinetics compared with the other infected groups, with a

progressive 1.7-fold decrease between D2 and D22. At the end of the experiment (D22), the concentration of soluble peroxides was significantly higher in the three

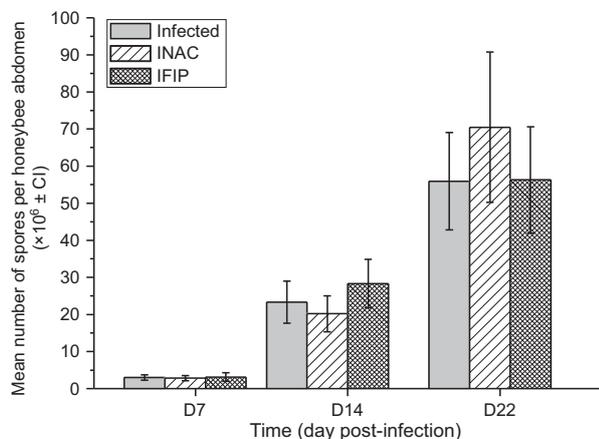


Fig. 4. Effect of exposure to fipronil or N-acetylcysteine on *N. ceranae* spore production.

The spore production in the whole abdomen was evaluated at 7, 14 and 22 days post-infection for the three conditions of infection (*N. ceranae* alone (Infected); supplemented with N-acetylcysteine 1 mM (INAC) or fipronil 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (IFIP)). The data represent the mean number of spores per honeybee abdomen ($\times 10^6$; error bars represents 95% confidence interval) from 24 (8×3 cages) honeybees per condition for D7 and D14 and 15 honeybees (5×3 cages) per condition for D22. A Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test was applied to compare the parasite load in the three infected groups (see Table S1).

uninfected groups than in their respective infected groups (Control versus Infected; NAC versus INAC; FIP versus IFIP; see Table S3).

To normalize the quantification of oxidized proteins, we first measured the concentration of total proteins in the bee midguts. Statistical analysis showed a decrease in protein concentration in the three infected groups (Infected, INAC and IFIP), which was only significant in the Infected and INAC groups. In these two groups, the cumulative protein concentration decreased approximately 1.4-fold compared with the control group (Fig. 8A1 and Table S2). Kinetic analysis of protein concentrations from D0 to D22 revealed that major differences between groups occurred at day 4 (Fig. 8A2). At D22, the three infected groups exhibited a significant decrease of approximately 1.5-fold compared with the control. The percentage of protein oxidation was then measured for each experimental group using a slot blot method after loading with the same concentration of total proteins. Figure 8B1 shows the cumulative percentage of protein oxidation between the different treatments. The Infected and INAC groups presented a major decrease of 1.4- and 1.3-fold, respectively, compared with the control. Surprisingly, a slight but not significant increase was observed in FIP compared with the control group. This trend was accentuated in the presence of *N. ceranae* (IFIP), with an increase of 1.2-fold compared with the control group and 1.7-fold compared with the

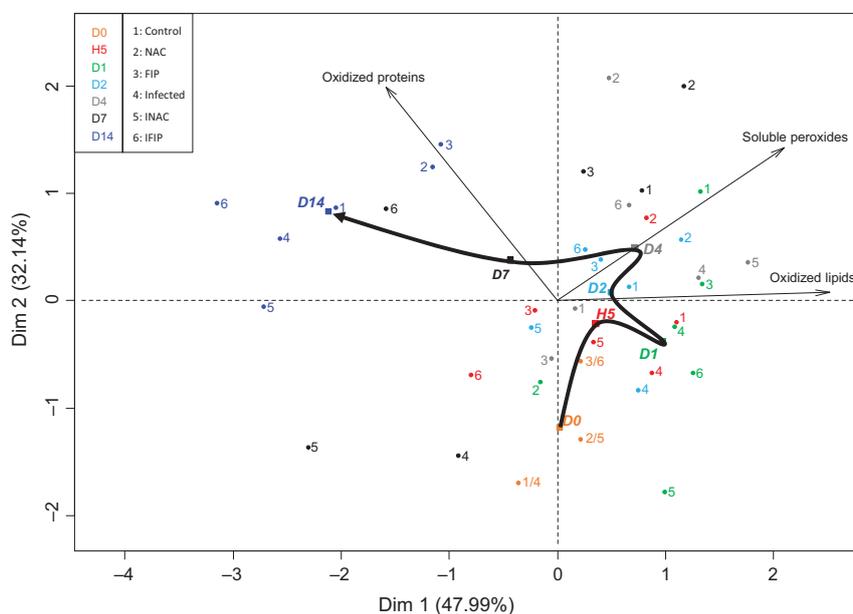


Fig. 5. Principal component analysis of the three variables (lipid oxidation, soluble peroxide production and protein oxidation) in the honeybee midguts during the experiment timeline.

The points of each group at different times in the experiment (D0–D14) were projected, and the barycentre of each day for all combined conditions was determined. The bold black arrow connects barycentre points to highlight the temporal order of the three events: lipid oxidation, soluble peroxide production and protein oxidation.

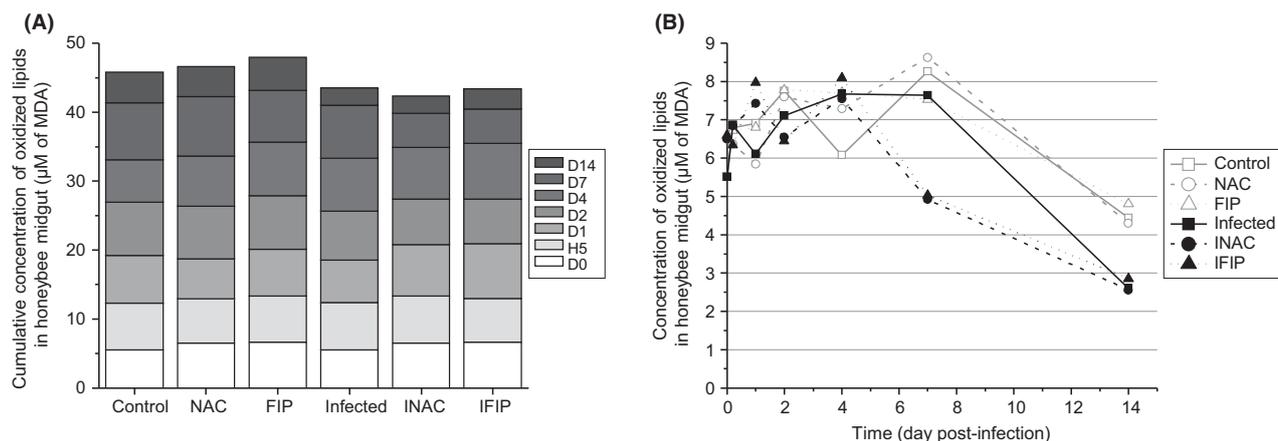


Fig. 6. Lipid peroxidation quantification in the midguts for the six experimental groups. The amount of oxidized lipids was determined from nine pools of three midguts for each of the six conditions per day, at seven time points, from D0 to D14. A represents the cumulative concentration of oxidized lipids of each experimental group, and B represents the kinetics of the oxidized lipid concentrations for the six groups. Each experimental group was compared with the control. Details regarding differences and *P*-values are reported in supporting information Tables S2 and S3.

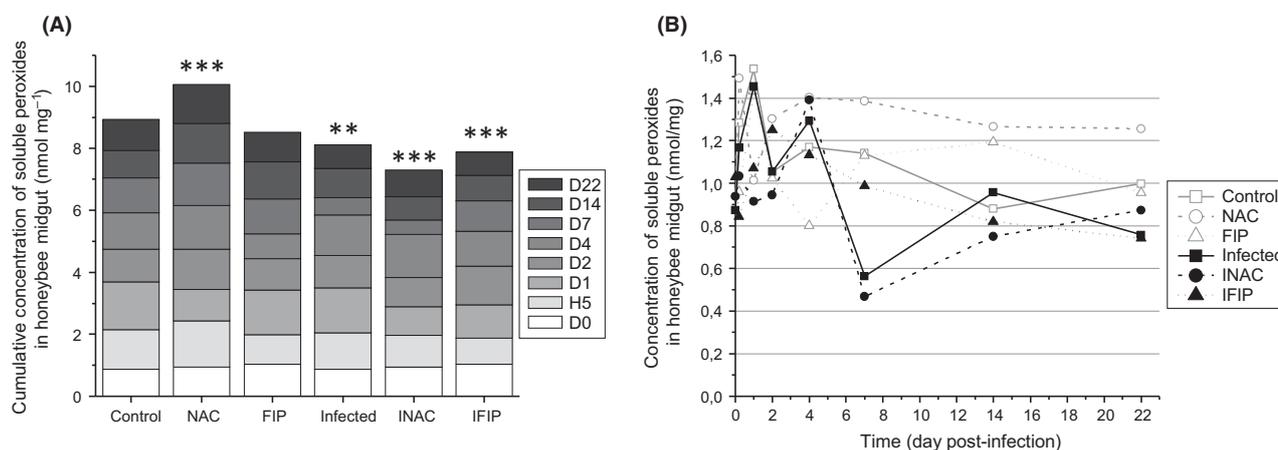


Fig. 7. Concentration of soluble peroxides in the midguts of honeybees exposed to fipronil or N-acetylcysteine and/or infected with *N. ceranae*. The amount of peroxides was evaluated with the ferrous ion oxidation–xylenol orange (FOX) method from 21 midguts/day/condition in quadruplicate. A represents the cumulative concentration of soluble peroxides for each group, and B represents the kinetics of the soluble peroxide concentrations for each group from D0 to D22. Asterisks indicate significant differences compared with the control group (***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.001). Details regarding *P*-values can be consulted in supporting information Tables S2 and S3.

infected group. The kinetics of protein oxidation from D0 to D22 is presented in Fig. 8B2. Except for the NAC group, we noted a constant increase in protein oxidation over time (highlighted with the PCA; see Fig. 5), which was more important and more constant in the IFIP group.

Discussion

The paradox of oxidative balance is that free radicals are extremely dangerous species, able to cause several types of cell damage, while being essential to life. Reactive oxygen species (ROS) serve important cell functions including signal transduction (Finkel, 2011), cell cycle

regulation (Chiu and Dawes, 2012) and immune defence against pathogens (Dupré-Crochet *et al.*, 2013). They also play some roles in cell differentiation, apoptosis (Delattre *et al.*, 2005) and gene regulation (redox control genes). Free radicals and ROS act as intra- and extra-cellular messengers, and their production may induce cellular responses to many stressors such as ultraviolet radiation, industrial pollutants and pesticides (Nathan and Cunningham-Bussell, 2013). At high concentrations, ROS can cause damage to different cell components such as DNA, lipids and proteins. For all these reasons, the organism needs to control the level of ROS in order to prevent oxidative stress, i.e. a disturbance in the balance between the production of ROS and antioxidants.

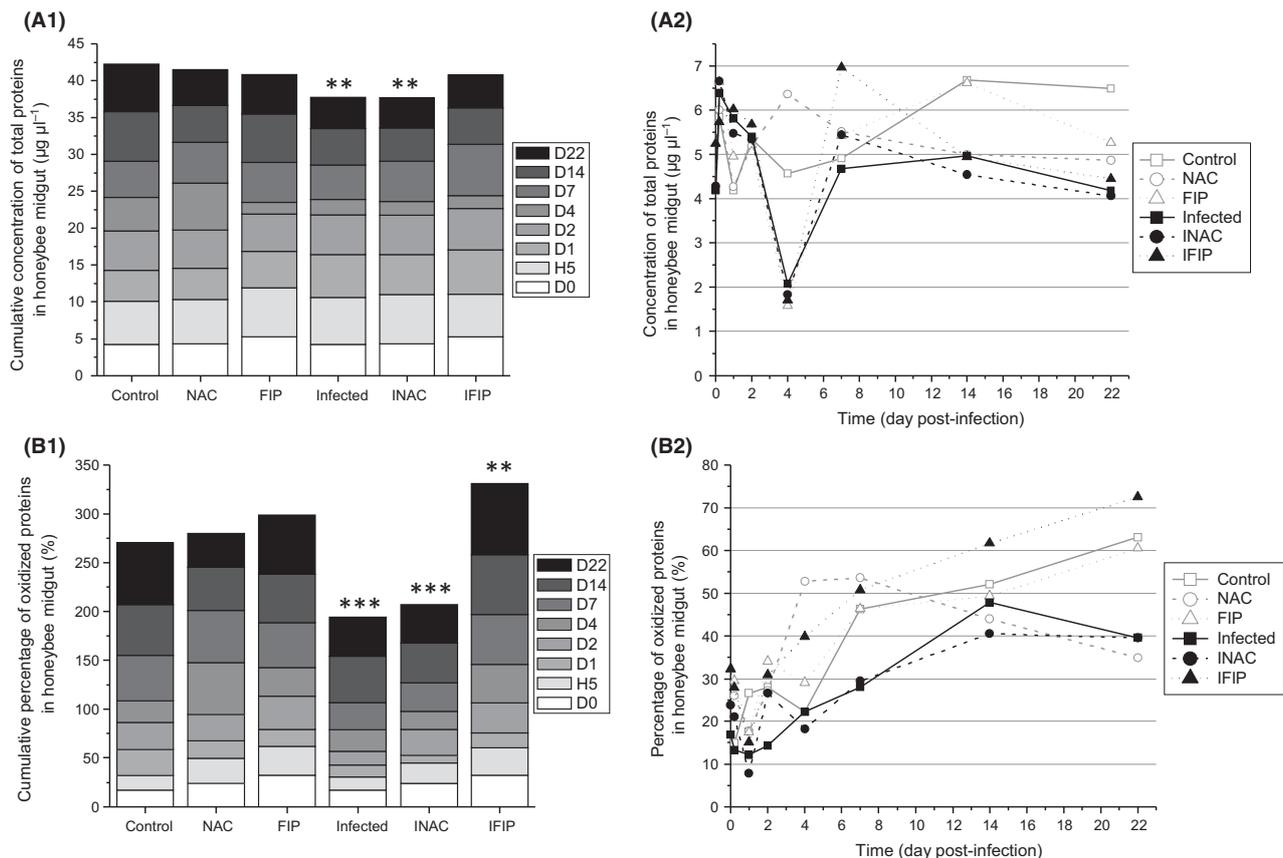


Fig. 8. Effect of the treatments on both protein concentration and protein oxidation. The measures were performed from 12 midguts/day/condition.

A. Quantification of midgut total protein concentration: A1, cumulative protein concentration for each group. A2, kinetic of protein concentration for each group.

B. B1, cumulative percentage of oxidized protein for each group. B2, kinetic of percentage of oxidized protein in bee midguts for the six experimental groups. Asterisks in A1 and B1 indicate significant differences compared with the control group (** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$). Details regarding P -values are reported in supporting information Tables S2 and S3.

In our study, we were wondering whether infection with the parasite *N. ceranae* combined with exposure to low doses of the insecticide fipronil could induce a disturbance of the oxidative balance in the honeybee midgut. Most of the studies conducted on ROS production in *N. ceranae*-infected bees focused on the detoxification system for these molecules, either through analyses of the midgut transcriptome or *via* measurement of the activity of enzymes involved in antioxidant systems (Vidau *et al.*, 2011; Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). These studies suggested an increase in ROS production during infection by *N. ceranae*, but no direct ROS quantification had been performed. In addition, exposition of bees to fipronil at low doses (1/10 and 1/20 of LD_{50}) led to an increase of catalase activity in the midgut, suggesting that fipronil could induce oxidative stress by producing H_2O_2 (Carvalho *et al.*, 2013). It should be noted that ROS quantification is challenging because of the short lifespan of these molecules and

their high reactivity (nanoseconds to seconds according to the molecular species).

We decided to measure soluble peroxides and ROS-induced damages through the quantification of both protein and lipid oxidation in the gut. The choice of the administered fipronil dose was based on preliminary tests and on the oral LD_{50} value of 4.17 ng bee^{-1} (Kievits and Bruneau, 2009). Consequently, bees were exposed daily to a mean quantity of fipronil of 1/298 of the LD_{50} . Considering the total duration of the experiment (22 days), the honeybees received a cumulative quantity of fipronil equivalent to the $\text{LD}_{50}/14$. Although this dose was initially considered sublethal (Vidau *et al.*, 2011), a significant mortality rate was observed in the fipronil-exposed group (approximately 40%) compared with the control group from the 15th day after the chronic exposure. We analysed the mortality rate and the feeding behaviour of honeybees without considering only cumulative consumption, commonly used in some

studies (Mayack and Naug, 2009; Vidau *et al.*, 2011), because this method may fail to reflect daily differences induced by the different treatments. The combined monitoring of mortality and sucrose consumption revealed that the increased mortality of bees co-exposed to *N. ceranae* and fipronil (IFIP) versus FIP group was not the result of more ingestion of fipronil. Indeed, despite a different consumption profile between FIP and IFIP, the total quantities absorbed were similar between these two groups (mean of 0.01 ng bee⁻¹ day⁻¹). In contrast, a difference has been found in the daily consumption between bees fed fipronil (FIP group) and the untreated control group ($P < 0.01$; Fig. 3). This difference may suggest that fipronil consumption negatively affected the appetite of the bees or that fipronil made the syrup less appealing to bees. However, no difference has been found in the daily consumption profile between the IFIP group and the control group. We thus hypothesized that the presence of the parasite may hide the negative effect of fipronil on consumption behaviour.

Our data indicated that infection with *N. ceranae* had a more severe impact on honeybee survival than exposure to low doses of fipronil. At the end of the experiment (D22), mortality reached approximately 60% in the group of *N. ceranae*-infected bees and approximately 40% for bees exposed to fipronil alone. Surprisingly, and in contrast to other studies (Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012), the *N. ceranae*-fipronil combination did not induce higher honeybee mortality compared with the infected group (Fig. 2). Additionally, the administration of the antioxidant N-acetylcysteine to both uninfected (NAC group) and infected bees (INAC group) did not modify the mortality rate compared with the control and infected groups, respectively. Both *N. ceranae*-infected and uninfected bees fed N-acetylcysteine consumed similar amounts of the antioxidant (approximately 5.25 ± 0.05 μg bee⁻¹ day⁻¹). Several studies revealed differences in honeybee susceptibility to infection by *N. ceranae*. Such differences may result from resistance or tolerance mechanisms mediated by the genetic variability of honeybees (Fontbonne *et al.*, 2013; Kurze *et al.*, 2016a, b) but could also be due to life-history traits of bee colonies used in the different studies. Indeed, sampled bees used for experimental studies may have been impacted in their colony by multiple factors including resources, contaminants or pathogens. All these factors may also influence the susceptibility of bees to fipronil in our laboratory conditions. Altogether, this could explain the variability of honeybee mortality rates observed in different studies under exposure to the *N. ceranae*-fipronil combination (Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014). In these studies, the *N. ceranae*-fipronil combination led to an increase in honeybee mortality with or without a synergistic effect, while in the present study, the

mortality rate was similar between bees treated with a single stressor and those exposed to a combination.

Ingestion of fipronil by honeybees did not have any effect on the *N. ceranae* spore production at the different time points (D7, D14 and D22) of the experiment (Fig. 4). Similar results have been previously reported by Aufauvre *et al.* (2012). In contrast, Vidau *et al.* (2011) observed significantly decreased spore production in infected bees exposed to fipronil compared with bees only infected with *N. ceranae*. However, in the latter study, exposure to another insecticide, thiacloprid, increased the *Nosema* spore count. Such contrasting effects of pesticides including insecticides, acaricides, herbicides and fungicides on *Nosema* spore load have been reported by Pettis *et al.* (2013) and Collison *et al.* (2015). Our study also revealed that the addition of N-acetylcysteine did not affect the spore load and did not increase survival, suggesting that this antioxidant neither stimulated the defences of *A. mellifera* against *N. ceranae* nor supported the parasite proliferation.

Oxidative stress is defined as a disturbance in the oxidative balance between the production of ROS and antioxidant defence molecules. Oxidative balance is required to preserve cellular homeostasis and to regulate ROS levels to enable their beneficial effects in many cell functions while preventing their toxic effects (Wang *et al.*, 2013). When honeybees were infected with *N. ceranae* (whatever the infected group, Infected, INAC or IFIP), the balance was disturbed in favour of a decrease in soluble peroxides (Fig. 7) and oxidized proteins (Fig. 8B). In contrast, when all days were observed, lipid oxidation (Fig. 6A) did not seem to be affected by the infection. However, on the 14th day, a significant decrease in lipid oxidation was observed in the three infected groups compared with the three uninfected groups (Fig. 6B and Table S3). As mortality was high in the three infected groups, the measurement of lipid oxidation could not be made after D14, while the quantification of both soluble peroxides and oxidized proteins was performed until D22. For this reason, we cannot exclude the possibility that lipid peroxidation could be affected later (i.e. after D14). Several studies have shown an increase in the activation of the detoxification system in honeybees infected with *N. ceranae*. Indeed, we observed a global increase in the expression of genes involved in detoxification such as those coding catalase, cytochrome P450 enzymes and glutathione peroxidase (Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). However, at the enzymatic level, only glutathione-S-transferase (GST) exhibited higher activity in infected bees (Dussaubat *et al.*, 2012). GST activity was also shown to significantly increase in both the fat body and the midgut of adult workers 10 days after infection with *N. ceranae* (Vidau *et al.*, 2011). Furthermore, a

proteomic analysis revealed that some antioxidant proteins including thioredoxin-like 2 and GST were more abundant in the midgut of infected honeybees (Vidau *et al.*, 2014). This increase in the detoxification system is consistent with our results as ROS markers (soluble peroxides and protein carbonylation) were decreased in *N. ceranae*-infected bees compared with uninfected bees. Interestingly, a decrease in ROS in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae was observed when they were infected with the microsporidium *Vairimorpha ephestiae* (Lozinskaia *et al.*, 2004). This decrease seemed to be linked to a decrease in phenoloxidase activity during the infection and to an increase in SOD and GST activity during the massive sporulation of *V. ephestiae*. Altogether, this ROS decrease could be the result of a manipulation by the parasite to protect itself from its host or a counterbalancing effect of increased energetic costs in the host due to the host-derived energy dependence of microsporidia. Indeed, microsporidia possess remnant mitochondria referred to as mitosomes that do not produce ATP. For this reason, these parasites are highly dependent on host mitochondria for ATP uptake, and during proliferation, they recruit host mitochondria near their plasma membrane (Higes *et al.*, 2007; Tsaousis *et al.*, 2008; Hacker *et al.*, 2014). However, oxidative phosphorylation generates not only ATP but also ROS from complexes I and III (Batty *et al.*, 2009; Finkel, 2011). Therefore, it can be hypothesized that *N. ceranae*, by increasing mitochondrial activity, may induce an augmentation of ROS production, thus triggering an increase in the detoxification systems of the host to counteract them. We also showed that *N. ceranae* infection led to a decrease in protein concentration in honeybee midguts (Fig. 8A). This is consistent with a recent study indicating that *N. ceranae* may affect hypopharyngeal gland protein synthesis, supporting the assertion that *N. ceranae* may disrupt protein metabolism in bees (Jack *et al.*, 2016). An elevation of peroxide concentration in midguts might indicate the activity of Duox, an NADPH oxidase known to be involved in gut immunity against several pathogens in *Drosophila* (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Buchon *et al.*, 2014). In our study, the decrease in soluble peroxides observed in all infected groups suggests that NADPH oxidase do not seem to be activated in the gut in the presence of *N. ceranae*.

Surprisingly, a significant increase in soluble peroxides was observed in uninfected bees fed N-acetylcysteine (NAC; Fig. 7), suggesting that the oxidative system is unbalanced in favour of peroxide production in the presence of the antioxidant. In contrast, in *Nosema*-infected bees treated with N-acetylcysteine (INAC), soluble peroxides, protein carbonylation and lipid peroxidation were decreased compared with the untreated control group. In

addition, the decrease in the amount of soluble peroxides was significantly higher in infected bees treated with N-acetylcysteine (INAC) than in bees only infected with *N. ceranae*. This suggests that the antioxidant may strengthen the effect of *N. ceranae* infection on soluble peroxide production.

Fipronil may act as a pro-oxidant molecule in neuronal cell cultures when used at 50–100 μ M (Ki *et al.*, 2012) and in bee midguts when it is assayed at 1/10 or 1/20 of the LD₅₀ (Carvalho *et al.*, 2013). In our study, although honeybees absorbed a mean quantity of fipronil of 1/14 of the LD₅₀, we did not observe any significant difference in the quantity of soluble peroxides or oxidative damage markers (lipid and protein oxidation) in uninfected bees treated with fipronil compared with the untreated control. In contrast, protein carbonylation increased 1.2-fold in the infected fipronil group (IFIP) compared with the control and by 1.7- and 1.6-fold compared with the Infected and INAC groups respectively. Protein carbonylation is an irreversible post-translational modification that can strongly alter protein function, leading to cell damage (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Proteins thus modified cannot be repaired and must be eliminated by the cell (Costa *et al.*, 2007); accordingly, carbonylated proteins are considered stable and suitable markers for oxidative stress that can be induced by almost all types of ROS (Shacter, 2000). Our results suggest that the pro-oxidant effect of fipronil would be only observed in bees infected with *N. ceranae*. This indicates that co-exposure of bees to both *N. ceranae* and fipronil would lead to increased oxidative stress. Similarly, increased oxidative stress was described in gammarids infected with the microsporidium *Dictyocoela* and exposed to cadmium, suggesting that infected organisms would be more susceptible to pollutants (Gismondi *et al.*, 2012).

As shown by the principal component analysis, no direct correlation could be observed between the production of soluble peroxides, lipid peroxidation and protein carbonylation. Although we hypothesized that production of soluble peroxides could cause direct damage to lipids and proteins, our results highlighted a temporal order in the appearance of the three oxidative stress markers upon intoxication with fipronil and/or infection with *N. ceranae*. The principal component analysis has clearly demonstrated that the level of protein oxidation was independent of the levels of soluble peroxide production and lipid oxidation, because the arrows of these last two variables were not projected in the same quarter as the oxidized protein arrow. A statistical correlation test was also performed on the production of soluble peroxides and oxidized lipids, and it did not show any link between these two events. The oxidation of lipids therefore did not appear to induce the production of soluble peroxides. In our study, we also observed a tendency

towards protein carbonylation at D14 for all samples, regardless of the treatment (Fig. 5). Although the amount of oxidized proteins is known to increase with age (Höhn *et al.*, 2013), we hypothesized that this increase observed in bees is partly related to the decrease in vitellogenin concentration over time. Vitellogenin, which plays a predominant role in bee lifespan, is a well-known antioxidant protein. Indeed, Seehuus *et al.* (2006) have shown that the resistance of bees to oxidative stress was linked to the expression of vitellogenin as this protein is a preferred target of carbonylation. Therefore, the observed increase in carbonylated proteins in all groups over the course of our experiment might be due to the decline in vitellogenin during the bee lifespan.

Our result, combined with other published transcriptomic and proteomic data, highlighted a decrease in the oxidative status of intestinal cells after infection with *N. ceranae*. In contrast, the higher level of protein oxidation observed for the *N. ceranae*–fipronil combination suggests that the parasite may increase fipronil toxicity. This finding could partially explain why, in some cases, we could observe a synergistic effect on *A. mellifera* mortality when *N. ceranae* was associated with low doses of fipronil.

Experimental procedure

Honeybee artificial rearing and infection procedure

The two experiments (Exp. 1 and Exp. 2) were performed with emergent honeybees from *Apis mellifera* (Buckfast) colonies from the same apiary at the Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement (UMR 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France). One frame of sealed brood for Exp. 1 and five frames for Exp. 2 were collected from five colonies and placed in incubators in the dark at 33°C with approximately 60% relative humidity. Emerging honeybees were collected directly on the frames, confined to Pain-type cages and maintained in incubators for 5 days before infection with *N. ceranae*. During this time, the bees were fed *ad libitum* with 50% sucrose syrup complemented with 1% nutritional supplement (Provita[®] Bee, ATZ Diétiétique). To mimic the hive environment, a small piece of PseudoQueen[®] (Contech Enterprises, Inc., Victoria, British Columbia, Canada) releasing a queen's mandibular pheromone was positioned in each cage. After 5 days of feeding, experimental groups were established and the infection procedure was performed.

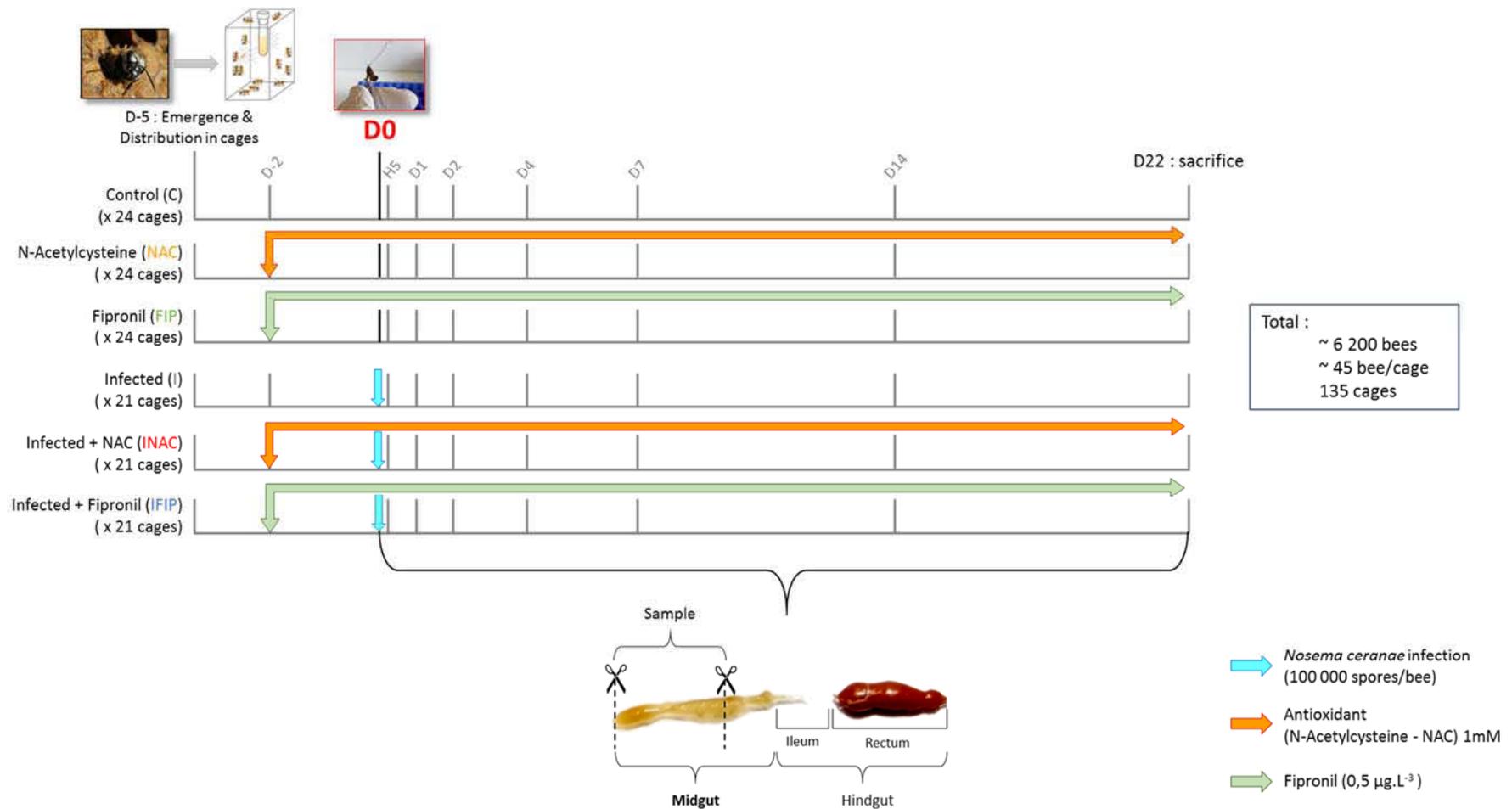
Nosema ceranae spores were obtained according to Roussel *et al.* (2015) one month before the experimentation. Spores were counted on a Kova[®] slide and stored at room temperature. The *N. ceranae* species identification was confirmed by PCR using specific primers amplifying the 16S rDNA gene of *N. ceranae* (NcD1 5'-

CGACGATGTGATATGGAAAAATATTA-3'; NcR1 5'-TCATTCTCAAACAAAAAACCCTTC-3') as previously described by Martín-Hernández *et al.* (2007). PCR was performed using the ProFlex[™] 96-well PCR System (Applied Biosystems[™], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The PCR was performed in 50 µl of reaction mixture using the GoTaq[®] G2 FlexiDNA Polymerase Kit (Promega, Madison, WI, USA) in the presence of 1.25 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM of each primer and 0.025 U µl⁻¹ DNA polymerase. After an initial DNA denaturation step at 95°C for 5 min, 35 cycles (denaturation at 95°C for 30 s, hybridization at 54°C for 30 s and elongation at 72°C for 1 min) were run, followed by a final extension step at 72°C for 15 min. Five days after their emergence, cage-confined bees (one group for Exp. 1 and three groups for Exp. 2) were anaesthetized with CO₂, and the cages were placed on ice before infection in order to keep the bees asleep and to inoculate the parasite easily but also to reduce the risk of injury to the bees and/or to the manipulator. Each honeybee individually received a dose of 100 000 *N. ceranae* spores in 3 µl of sucrose 50%. The uninfected bees (one group for Exp. 1 and three groups for Exp. 2) were only anaesthetized with CO₂ and placed in cages on ice to induce the same major stress. The time of infection with *N. ceranae* determined the D0 of each experiment.

Primary experiment (Exp. 1)

Experimental design. A first experiment was conducted to measure the difference in the amount of ROS in the midgut of uninfected and infected honeybees. Towards that aim, 840 bees comprising 20 individuals per cage from one frame were used to form two groups: uninfected bees (Control) and infected bees (Infected). Five days after emergence, which determined the D0 of the experiment, 420 bees received individually 100 000 spores of *Nosema ceranae*. At different times post-infection (D0, H5, D1, D2, D4, D7 and D17), eight midguts/cage in three cages/condition (total 24 midguts/condition) were sampled. Only the first two-thirds of the midgut were used to measure the concentration of ROS fluorescence.

ROS quantification with a ROS-sensitive fluorescent probe (CM-H₂DCFDA). The following protocol was developed for the first time in this experiment for the quantification of ROS in whole tissue according to the instructions of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). Four midguts from each cage were individually treated with the ROS-sensitive fluorescent probe CM-H₂DCFDA (Molecular Probes[®], Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), which is an indicator for different ROS (H₂O₂, HO,



Experimental design of the experiment 2: analysis of the oxidative balance in honeybee midguts following infection by *N. ceranae* and/or exposure to the insecticide fipronil, or the N-acetylcysteine antioxidant. 6 experimental conditions were formed: 3 uninfected groups and 3 *N. ceranae*-infected groups. At the emergence, 45 bees were placed in each cages and the 3 infected groups received individually the parasite spores (100 000 spores per bee) at D0. N-acetylcysteine (1 mM) and fipronil (5 µg/L) were administered *via* the nutrition syrup 2 days before infection. Between D0 and the end of experiment (D22), around 2 000 honeybee midguts were collected at 8 times points for analysis of lipids and proteins oxidation and soluble peroxide measurement and around 200 bees were used to estimate the spore load.

HOCl and COO⁻), and four other midguts per cage were not treated with the probe to determine and subtract the natural fluorescence. The probe was used at a 10 μM concentration in PBS in the presence of a catalase inhibitor at 2 mg ml⁻¹ (3-amino-1,2,4-triazol, Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, Missouri, USA), and the midguts were incubated for 20 min at RT in the dark. The midguts were then washed in PBS and crushed in 100 μl of PBS. Four hundred microlitres of PBS was added, and the mixture was homogenized by vortexing. One hundred microlitres of each sample was loaded on a 96-well plate in quadruplicate, and the plate was read (excitation: 485 nm per emission: 538 nm). The fluorescence for one condition was calculated by deducting the natural fluorescence (fluorescence mean of midguts not incubated in CM-H₂DCFDA fluorescent probe), and the results from each day were compared.

Second experiment (Exp. 2)

Experimental design. To obtain enough emergent bees (\approx 6500), we took five frames of sealed brood from five colonies in the same apiary. After 5 days of feeding as described in Exp. 1, six experimental groups were established: (i) uninfected bees (Control), (ii) bees infected with *N. ceranae* (Infected), (iii) bees fed with syrup supplemented with 1 mM N-acetylcysteine (NAC), (iv) bees infected with *N. ceranae* and fed with 1 mM NAC (INAC), (v) bees fed with syrup supplemented with 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ fipronil (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich; FIP) and (vi) bees infected with *N. ceranae* and exposed to 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ fipronil (IFIP). Each experimental group was composed of 24 cages, each of which contained 45 bees (1080 bees per group) equally distributed from the five different colonies (i.e. nine bees from each colony per cage). Fipronil and N-acetylcysteine treatments were administered 2 days before the infection that occurred 5 days after the emergence of bees (see below infection procedure). A stock solution of fipronil (70 g l⁻¹) was prepared in DMSO, leading to a final percentage of 0.0025% DMSO in the feeding syrup. Therefore, caged honeybees from the Control, NAC, Infected and INAC groups were also fed with 0.0025% DMSO-containing sucrose syrup. During the whole experiment, the honeybees were fed *ad libitum* with 50% sucrose syrup with 1% of Provita' Bee (ATZ Dietetic), complemented or not with fipronil or NAC according to their experimental group. Every day, any dead bees were removed and scored, and sucrose consumption was quantified.

Midgut dissection and sampling method. Honeybees were anaesthetized with CO₂ and euthanized by crushing of the thorax to ensure instantaneous death. The intestinal tract was dissected on a glass plate

maintained on ice, and the first two-thirds of the midgut was isolated and weighed before being immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C . The sampling was performed at D0, five hours (H5) and 1, 2, 4, 7, 14 and 22 days after infection with *N. ceranae*. For each day, bees from three cages were euthanized for each of the six experimental conditions. Seven individual midguts/cage/condition/day were sampled for soluble peroxide measurement, four individual midguts/cage/condition/day for protein carbonylation and three pools of five midguts/cage/condition/day for measurement of malondialdehydes (a reliable marker of lipid oxidation). A minimum of five bees/cage/condition/day were conserved at -20°C for the counting of *N. ceranae* spores. The abdomen of each bee was dissected and homogenized in PBS using a manual tissue grinder. The parasite load was determined by counting with a haemocytometer chamber, and the Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney analysis was used to compare the parasite load in the three infected groups.

Quantification of soluble peroxides in honeybee midguts. Midguts stored at -80°C were placed on ice and then crushed in 35 μl of catalase inhibitor (2 mg ml⁻¹) and centrifuged at 15 000 g for 5 min. Thirty microlitres of the supernatant was stored at -80°C . For measurement, 10 μl of each sample was diluted to 1:5 and added to 950 μl of FOX reagent (sorbitol 100 mM; orange xylene 100 μM ; ferrous ammonium sulphate 250 μM ; H₂SO₄ 25 mM) for 30 min of incubation at RT. To establish the standard curve, we prepared and treated a range of H₂O₂ concentrations in the same manner as the experimental samples. One hundred microlitres of each sample was loaded on a 96-well plate in quadruplicate, and the plate was read at 596 nm using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Analysis of carbonylated proteins: preparation of the carbonylated BSA. A standard for carbonylation was prepared according to the protocol described by Yoo and Regnier (2004). Percentage of oxidation was controlled with standard carbonyl-BSA (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA). The oxidized BSA was frozen until used. Quantification of protein carbonyl groups is often used as an indicator of protein oxidation (Yoo and Regnier, 2004), and the relatively early formation and high stability of carbonylated proteins (Dalle-donne *et al.*, 2003) make this measure a suitable representation of global protein oxidation.

Analysis of carbonylated proteins: extraction and dosage of protein concentration. Midguts stored at -80°C were placed on ice and then crushed in 1 ml of RIPA buffer

per 100 mg of tissue (RIPA buffer: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, DOC 0.5%, NP-40 1%, SDS 0.1%) supplemented with PMSF 1 mM. The samples were incubated 15 min on ice and homogenized by vortexing for 5 min, and then centrifuged at 14 000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatants were diluted to 1:40 for the Bradford assay and the rest was conserved at -80°C. The quantification of global proteins was performed following the protocol of the Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit (Thermo Scientific). All samples were measured in triplicate at 596 nm.

Analysis of carbonylated proteins: protein derivation and slot blotting. The protocol was developed from previous studies (Robinson *et al.*, 1999; Dalle-donne *et al.*, 2003) and adjusted for our study as follows: 50 µg of protein was incubated for 10 min at RT with SDS 20% at volume ratio of 1:0.5. One volume of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH 5 mM final), diluted in HCL 2N, was added. The reaction was performed at RT for 30 min with homogenization every 10 min. One volume of neutralization buffer (Tris-Base 2M; glycerol w/v 30%) was added. Three micrograms of protein samples and a range of carbonylated BSA quantities were slot-blotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a slot blotter (PR 600 slot blot, Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA). The membranes were treated with a primary anti-DNP antibody (clone 9H8.1, Millipore™, Billerica, MA, USA) diluted at 1:2000 and then with a secondary antibody (anti-mouse IgG HRP conjugate, Promega) diluted at 1:2500. Slot blot detection was performed using chemiluminescence (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad), and the readings were taken with an analyser (ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Lipid peroxidation in honeybee midguts. Lipid peroxidation (corresponding to the oxidation of unsaturated lipids) was titrated using the TCA method (TBARS Assay Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), which permitted us to measure malondialdehyde (MDA). The fluorometric version of the measure was conducted on a pool of three guts for each sample. Nine pools were measured in duplicate for each condition per day. The measurement of MDA with the TBARS method was considered representative of global lipid peroxidation.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using STATA software, version 13 (StataCorp, College Station, TX, USA) and R 3.2.5 software (<https://cran.r-project.org/>). The tests were two-sided, with a type I error rate set at $\alpha = 0.05$. Quantitative results were presented as the

mean \pm confidence interval (CI), according to statistical distribution (assumption of normality assessed using different tests: Shapiro–Wilk, Kolmogorov–Smirnov, Jarque–Bera and D’Agostino tests). Box–Cox transformation was applied to achieve normality when appropriate. Bee survival was analysed using the Kaplan–Meier method and compared using a Cox–Mantel test, and the success of *N. ceranae* development was estimated using a Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test. For the results of consumption and analysis of the midgut samples, mixed models were used to take into account between- and within-cage effect variability. Random-effects models for correlated measures were used in place of usual statistical tests, which would be not appropriate because the independence of the data was not verified. Finally, principal component analysis (PCA) was considered to identify a set of latent constructs underlying some measured variables (oxidized lipids and proteins, and soluble peroxides). More precisely, we explored honeybee midguts over the course of the experimental timeline.

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the French Agence Nationale de la Recherche (BEELOSS programme, grant number ANR-12-BSV3-0020). LP was supported by grants from the ‘Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche’. We thank Prof André Lebert for his advice on statistical methods (Pascal Institute, Clermont Auvergne University) and Ayhan Kocer for his advice on oxidative stress. We also thank Laetitia Juillard and Anaïs Sabatier (Clermont Auvergne University) for their technical support during sampling.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., *et al.* (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol* **12**: 774–782.
- Aliferis, K.A., Copley, T., and Jabaji, S. (2012) Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J Insect Physiol* **58**: 1349–1359.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., and Gauthier, M. (2009) Subchronic exposure

- of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ Toxicol Chem* **28**: 113–122.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* **11**: 2284–2290.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., et al. (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., and Blot, N. (2014) Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE* **9**: e91686.
- Batty, E., Jensen, K., and Freemont, P. (2009) PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 1182–1196.
- Bernadou, A., Démare, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J.C., and Gauthier, M. (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J Insect Physiol* **55**: 1099–1106.
- Bevilacqua, E., Gomes, S.Z., Lorenzon, A.R., Hoshida, M.S., and Amarante-Paffaro, A.M. (2012) NADPH oxidase as an important source of reactive oxygen species at the mouse maternal-fetal interface: putative biological roles. *Reprod Biomed Online* **25**: 31–43.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014) Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* **14**: 796–810.
- Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G.A., Brunet, J.-L., and Badiou-Beneteau, A. (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem* **32**: 2117–2124.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., and Pettis, J.S. (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J Insect Physiol* **58**: 1090–1095.
- Chiu, J., and Dawes, I.W. (2012) Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol* **22**: 592–601.
- Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., et al. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* **15**: 615–636.
- Colin, M.E., Bonmatin, J.M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., and Vermandere, J.P. (2004) Environmental contamination and TA method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch Environ Contam Toxicol* **39**: 387–395.
- Collison, E., Hird, H., Cresswell, J. and Tyler, C. (2016) Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health – a critical analysis. *Biol Rev* **91**: 1006–1019.
- Costa, V., Quintanilha, A., and Moradas-Ferreira, P. (2007) Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life* **59**: 293–298.
- Cousin, M., Silva-Zacarin, E., Kretzschmar, A., El Maataoui, M., Brunet, J.-L., and Belzunces, L.P. (2013) Size changes in honey bee larvae oenocytes induced by exposure to Paraquat at very low concentrations. *PLoS ONE* **8**: e65693.
- Dalle-donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* **329**: 23–38.
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med* **10**: 389–406.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Menach, K.Le., Budzinski, H., Cluzeau, S., and Pham-del, M.H. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch Environ Contam Toxicol* **250**: 242–250.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P. and Gauthier, M. (2011) Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* **20**: 429–437.
- Delattre, J., Beaudeau, J.-L., and Bonnefont-Rousselot, D. (2005) *Radicaux Libres et Stress Oxydant: Aspects Biologiques et Pathologiques*. Paris: Tech & Doc.
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., and Nüße, O. (2013) ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol* **94**: 657–670.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., et al. (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* **7**: e37017.
- Dussaubat, C., Sagastume, S., Gómez-Moracho, T., Botías, C., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., et al. (2013) Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Vet Microbiol* **162**: 670–678.
- El Hassani, A.K., Dacher, M., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* **82**: 30–39.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., et al. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* **15**: 645–656.
- FAO (2017) Food and Agriculture Organization of the United – FAOSTAT – faostat.fao.org.
- Ferrandon, D. (2013) The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr Opin Immunol* **25**: 59–70.
- Finkel, T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* **194**: 7–15.
- Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., et al. (2013) Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infect Genet Evol* **17**: 188–194.
- Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* **103**: S73–S79.
- García-palencia, P., Martín-hernández, R., Marin, P., Meana, A., and Higes, M. (2010) Natural infection by

- Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Apic Res* **49**: 278–283.
- Gismondini, E., Rigaud, T., Beisel, J.N., and Cossu-Leguille, C. (2012) Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid. *Environ Pollut* **160**: 17–23.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., and Spivak, M. (2013) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS ONE* **8**: e58165.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., and Rotheray, E.L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**: 1255957.
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., and Lucocq, J. (2014) Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cell Microbiol* **16**: 565–579.
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* **92**: 93–95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol* **94**: 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2010) Review article *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**: 375–392.
- Higes, M., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., et al. (2013) Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Rep* **5**: 530–536.
- Höhn, A., König, J., and Grune, T. (2013) Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins ☆. *Sci Direct* **92**: 132–159.
- Holmstrup, M., Bindsbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., et al. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* **408**: 3746–3762.
- Jack, C.J., Uppala, S.S., Lucas, H.M., and Sagili, R.R. (2016) Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *J Insect Physiol* **87**: 12–19.
- Ki, Y.-W., Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., and Koh, H.C. (2012) Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol Lett* **211**: 18–28.
- Kievits, J. and Bruneau, E. (2007) Neurotoxiques systémiques, un risque pour les abeilles? *Abeilles & Cie* **118**: 12–17.
- Kohen, R., and Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* **30**: 620–650.
- Kurze, C., Le Conte, Y., Dussaubat, C., Erler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., et al. (2015) *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. *PLoS ONE* **10**: e0140174.
- Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G.I., Le Conte, Y., Kryger, P. and Moritz, R.F.A. (2016a) *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitol Res* **115**: 2381–2388.
- Kurze, C., Routtu, J., and Moritz, R.F.A. (2016b) Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology* **119**: 290–297.
- Laurent, M., Hendrikx, P., Ribière-Charbert, M., Chauzat, M., and EPILOBEE Consortium (2016) A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012–2014 – EPILOBEE Report. URL <https://sites.anses.fr/en/minisite/abeilles/epilobee>.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697–743.
- Lozinskaia, Y.L., Slepneva, I., Khramtsov, V.V., and Glupov, V.V. (2004) Change of the antioxidant status and free radicals production in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae in microsporidiosis. *J Evol Biochem Physiol* **40**: 99–103.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., and Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6331–6338.
- Martín-Hernández, R., Higes, M., Sagastume, S., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Budge, G.E., et al. (2017) Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS ONE* **12**: e0170183.
- Mayack, C., and Naug, D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* **100**: 185–188.
- Mayack, C., and Naug, D. (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J Insect Physiol* **56**: 1572–1575.
- Nathan, C., and Cunningham-Bussel, A. (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* **4**: 349–361.
- Nazzi, F., and Pennacchio, F. (2014) Disentangling multiple interactions in the hive ecosystem. *Trends Parasitol* **30**: 556–561.
- Neumann, P., and Carreck, P. (2010) Honey bee colony losses. *J Apic Res* **49**: 1–6.
- Nikolenko, A.G., Saltykova, E.S., and Gaifullina, L.R. (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., and Farooqui, A.A. (eds). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, pp. 279–293.
- Pettis, J.S., Vanengelsdorp, D., Johnson, J., and Dively, G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**: 153–158.
- Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., and VanEngelsdorp, D. (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **8**: e70182.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* **25**: 345–353.

- du Rand, E.E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W., and Nicolson, S.W. (2015) Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci Rep* **5**: 11779.
- Retschnig, G., Williams, G.R., Mehmman, M.M., Yañez, O., de Miranda, J.R., and Neumann, P. (2014) Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* **9**: e85261.
- Robinson, C.E., Keshavarzian, A., Pasco, D.S., Frommel, T.O., Winship, D.H., and Holmes, E.W. (1999) Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem* **266**: 48–57.
- Roussel, M., Villay, A., Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., et al. (2015) Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr Polym* **133**: 213–220.
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., and Amdam, G. V (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **103**: 962–967.
- Shacter, E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Durg Metab Rev* **32**: 307–326.
- Smith, M.L. (2012) The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS ONE* **7**: 1–6.
- Sun, X., Komatsu, T., Lim, J., Laslo, M., Yoltz, J., Wang, C., et al. (2012) Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **11**: 783–793.
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A.V., Lucocq, J.M., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**: 553–557.
- VanEngelsdorp, D., and Meixner, M.D. (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.
- VanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., and Pettis, J. (2009) A survey of honey bee colony losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE* **3**: 7–14.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., 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.
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., et al. (2014) Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol* **121**: 89–96.
- Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., and Cheng, H. (2013) Imaging ROS signaling in cells and animals. *J Mol Med* **91**: 917–927.
- Williams, B.A.P. (2009) Microreview unique physiology of host – parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* **11**: 1551–1560.
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., and Sheppard, W.S. (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J Invertebr Pathol* **109**: 326–329.
- Yoo, B.-S., and Regnier, F.E. (2004) Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining. *Electrophoresis* **25**: 1334–1341.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. *P*-values obtained between different conditions with statistical analysis of consumptions and survival data for Exp.2.

Table S2. *P*-values obtained between different conditions with statistical analysis for Exp. 2.

Table S3. Experimental days where a significant difference was observed between different conditions with statistical analysis for Exp. 2.

Supporting Information

Table S1. P-values obtained between different conditions with statistical analysis of consumptions and survival data for Exp.2. P-values were acquired when we compared two groups considering all combined days. For sucrose, N-acetylcysteine and fipronil, a mixed model analysis was applied on data, while for survival, Cox-Mantel test was used and finally, Kruskal-Wallis followed by Dunn test were chosen for the spore production. Ctrl: Control; Inf.: Infected.

Treatment conditions	Sucrose 50% + 1% Provita'Bee consumption p-values	N-acetylcysteine 1 mM consumption p-values	Fipronil 0.5 µg/L consumption p-values	Honeybee survival p-values	Spore production p-values
Ctrl vs NAC	0.121	-	-	0.136	-
Ctrl vs FIP	< 0.001	-	-	< 0.001	-
Ctrl vs Inf.	0.072	-	-	< 0.001	-
Ctrl vs INAC	0.362	-	-	< 0.001	-
Ctrl vs IFIP	0.189	-	-	< 0.001	-
NAC vs FIP	0.194	-	-	< 0.001	-
NAC vs Inf.	0.996	-	-	< 0.001	-
NAC vs INAC	0.948	0.446	-	< 0.001	-
NAC vs IFIP	0.999	-	-	< 0.001	-
FIP vs Inf.	0.249	-	-	< 0.001	-
FIP vs INAC	0.029	-	-	< 0.001	-
FIP vs IFIP	0.086	-	0.065	< 0.001	-
Inf. vs INAC	0.608	-	-	0.100	0.399
Inf. vs IFIP	0.860	-	-	0.819	0.469
INAC vs IFIP	0.688	-	-	0.959	0.919

Table S2. P-values obtained between different conditions with statistical analysis for Exp. 2. P-values were acquired when we compared two groups considering all combined days for each of the four measures with the application of a statistical mixed model. Ctrl: Control; Inf.: Infected.

Treatment conditions	Soluble peroxides p-values	Lipid peroxidation p-values	Total proteins p-values	Protein carbonylation p-values
Ctrl vs NAC	0.002	0.716	0.666	0.603
Ctrl vs FIP	0.252	0.309	0.385	0.134
Ctrl vs Inf.	0.023	0.298	0.006	< 0.001
Ctrl vs INAC	< 0.001	0.113	0.006	0.001
Ctrl vs IFIP	0.003	0.255	0.386	0.002
NAC vs FIP	0.001	0.944	0.987	0.797
NAC vs Inf.	< 0.001	0.502	0.083	< 0.001
NAC vs INAC	< 0.001	0.189	0.079	0.006
NAC vs IFIP	< 0.001	0.434	0.987	0.034
FIP vs Inf.	0.592	0.114	0.175	< 0.001
FIP vs INAC	0.002	0.027	0.168	< 0.001
FIP vs IFIP	0.196	0.090	1.000	0.269
Inf. vs INAC	0.037	0.829	0.999	0.699
Inf. vs IFIP	0.748	0.994	0.122	< 0.001
INAC vs IFIP	0.093	0.655	0.060	< 0.001

Table S3. Experimental days where a significant difference was observed between different conditions with statistical analysis for Exp. 2. P-values were acquired when we compared two groups considering each day taken independently for each of the four measures with the application of Kruskal-Wallis followed by Dunn tests. /: no difference. Ctrl: Control; Inf.: Infected.

Treatment conditions	Soluble peroxides	Lipid peroxidation	Total proteins	Protein carbonylation
Ctrl vs NAC	1 to 22	1	4, 14, 22	H5, 4, 7, 22
Ctrl vs FIP	0, H5, 4, 14	4	0, H5, 4	0, H5, 2
Ctrl vs Inf.	7, 22	1,4,14	1, 4, 14, 22	1, 2, 22
Ctrl vs INAC	H5, 1, 4, 7	2,4,7,14	H5, 1, 4, 14, 22	1, 14, 22
Ctrl vs IFIP	H5, 1, 22	1,2,4,7,14	1, 4, 7, 14, 22	H5, 1, 4, 14
NAC vs FIP	H5,1, 2, 4, 22	/	0, 4, 14	4, 22
NAC vs Inf.	H5, 1, 2, 7, 14, 22	14	1, 4	H5, 2, 4, 7
NAC vs INAC	H5, 2, 7, 14, 22	1, 2, 7, 14	1, 4	1, 4, 7
NAC vs IFIP	H5, 4, 7, 14, 22	1, 7, 14	1, 4	4, 14, 22
FIP vs Inf.	H5, 4, 7, 14	14	1, 7, 14	H5, 2, 7, 22
FIP vs INAC	1, 4, 7, 14	2, 7, 14	14	1, 2, 4, 7, 22
FIP vs IFIP	H5, 1, 2, 4, 14, 22	1, 2, 7, 14	1, 14	4, 14
Inf. vs INAC	1	1, 7	/	2
Inf. vs IFIP	H5, 1, 7	1, 7	7	H5, 2, 4, 7, 22
INAC vs IFIP	H5, 1, 2, 4, 7	H5	/	1, 4, 7, 14, 22

**Chapitre 3 : Impact de la
microsporidie *Encephalitozoon cuniculi*
et du fipronil sur le stress oxydant
dans les cellules de mammifères en
culture *in vitro***

*“La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.*

*Ici, nous avons réuni théorie et pratique :
Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !”*

Albert Einstein

L'étude du stress oxydant que nous avons abordée dans le chapitre précédent chez les abeilles exposées à *Nosema ceranae* et/ou au fipronil, nous a permis de constater que

- (i) la microsporidie entraînait une diminution la production d'espèces réactives de l'oxygène, mais aussi une réduction de l'oxydation des cibles (lipides et protéines) ;
- (ii) la présence de fipronil quant à elle, n'a pas modifié la production de peroxydes solubles, et a eu tendance à entraîner une augmentation de l'oxydation des lipides et des protéines, bien que ceci n'ait pas été confirmé statistiquement ;
- (iii) le fipronil administré aux abeilles infectées n'a pas modifié la production de peroxydes ni la quantité de lipides oxydés par rapport aux abeilles infectées non-intoxiquées, mais *à contrario*, une forte augmentation de la concentration des protéines oxydées a été mesurée.

Nous avons voulu savoir, dans un contexte où l'interaction est réduite uniquement à la cellule hôte et son parasite, si la présence des microsporidies engendrait également une diminution de la production des ERO, et si l'addition de fipronil modifiait la balance.

En effet, les études *in vitro* menées sur des cellules en culture permettent de nous affranchir de l'ensemble des systèmes de l'organisme, et de contrôler un plus grand nombre de paramètres expérimentaux.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a encore porté sur l'interaction microsporidies/pesticide en culture *in vitro*, bien que plusieurs recherches aient été menées sur les mécanismes d'invasion des microsporidies et sur les effets d'une infection sur les cellules, ou bien sur les mécanismes d'action des pesticides.

Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à étudier les effets d'une co-exposition microsporidies/pesticide sur la balance oxydante de cellules en culture. Confrontée à diverses difficultés techniques, plusieurs verrous ont pu être levés, dont les résultats sont exposés dans la prépublication ci-après. J'ai cependant rencontré de nombreuses difficultés et des alternatives ont dû être prises. L'étude a donc été menée ici sur des cellules de mammifères infectées par une autre espèce microsporidienne que la précédente étude, *Encephalitozoon cuniculi*, en association ou non avec le fipronil.

1. Choix du modèle cellulaire et microsporidien

Les deux principales difficultés ont été l'absence de lignées cellulaires d'abeilles disponibles et l'impossibilité de cultiver *Nosema ceranae* en culture cellulaire.

1.1. La culture des cellules d'abeille : un succès éphémère ?

Il n'existe en effet aucune lignée cellulaire d'abeille commercialisée. Bien que la mise en culture de cellules ait déjà montré un certain succès, il est difficile de maintenir les cellules de façon permanente. Des protocoles ont été établis afin de permettre la culture de cellules primaires (Genersch *et al.*, 2013), c'est-à-dire la mise en culture de cellules isolées à partir d'œufs (Goblirsch *et al.*, 2013b; Ju & Ghil, 2015) ou de larves d'abeilles (Hunter, 2010), mais les cellules n'ont pu être repiquées qu'un nombre de fois très limité (Hunter, 2010; Goblirsch *et al.*, 2013b). Le protocole proposé en 2015 par Ju et Ghil permettrait cependant de conserver les cellules en continu durant au moins 45 repiquages successifs, apportant ainsi un espoir de développement d'une lignée stable et utilisable pour les futures expérimentations.

1.2. Cultiver *N. ceranae* en culture de cellule, un défi difficile à relever

D'autres types cellulaires ont été développés pour la mise en culture des pathogènes d'abeilles, notamment des cellules d'insectes autres que l'abeille. Ainsi, Gisder et ses collaborateurs ont réussi à cultiver *N. ceranae* et *N. apis* sur des cellules issues des cellules d'ovaires (lignée IPL-LD-65Y) de *Lymantria dispar* (*Bombyx disparate*) (Gisder *et al.*, 2011). Les différents stades de développement des microsporidies ont été observés, ainsi que la formation de foyers secondaires attestant de leur capacité de propagation. Ils n'ont cependant obtenu qu'un taux d'infection de 15 à 30% pour *N. ceranae* et de 5 à 10% pour *N. apis*. Ces résultats leur ont toutefois permis d'utiliser la culture de *N. ceranae* afin d'étudier *in vitro* différentes nouvelles molécules autre que la fumagilline, pour limiter le développement parasitaire (Gisder & Genersch, 2015). Cependant, Gisder et collaborateurs n'ont pas confirmé la capacité infectante des spores de *N. ceranae* produites *in vitro* puisqu'aucun test d'infection d'abeilles n'a été ensuite réalisé (Gisder *et al.*, 2011).

89

Leur protocole publié en 2011 a également été testé au laboratoire sur la même lignée cellulaire, mais sans succès. Aussi, différents protocoles ont ainsi été testés au sein de l'équipe afin de développer *N. ceranae* en culture. Plusieurs types ou lignées cellulaires d'insectes et de mammifères ont été utilisés, et des résultats encourageants ont été obtenus avec des cellules de fibroblastes humains HFF (*Human Foreskine Fibroblast*).

1.3. Les cellules HFF

L'inconvénient que présentent les cellules d'insectes, est que celles-ci sont semi, voire non adhérentes aux flasques ou plaques utilisés en culture cellulaire, ce qui présentait un obstacle important pour mes expérimentations. En effet, souhaitant infecter puis exposer les cellules à plusieurs doses de différentes molécules lors de mes tests, et la non-adhérence des cellules aurait été un obstacle trop important lors du marquage de mes cellules avec les sondes utilisées pour l'étude.

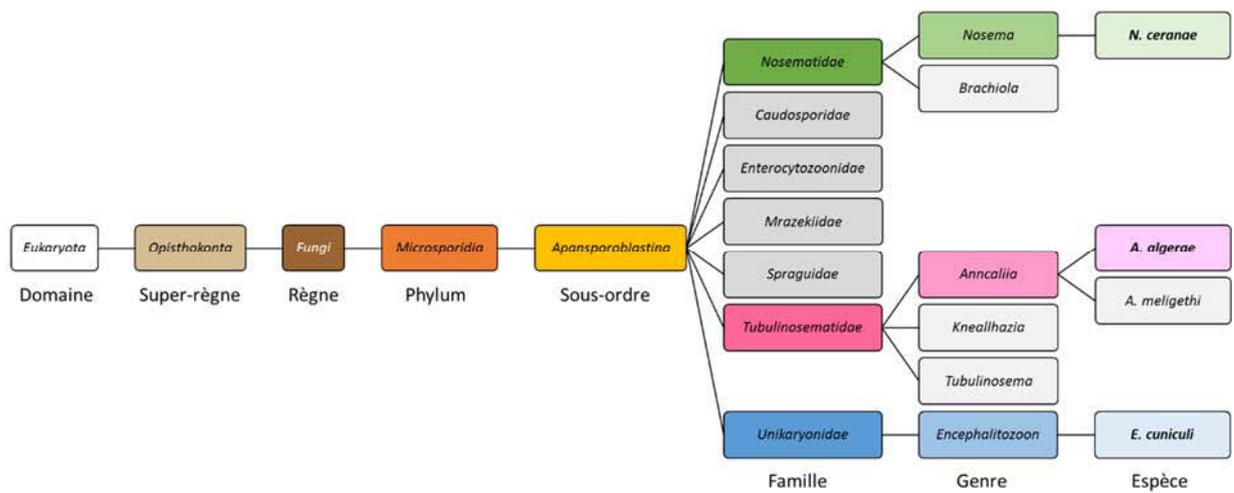


Figure 49. Phylogénie des microsporidies des genres *Encephalitozoon* et *Nosema*. Le genre *Encephalitozoon* (en bleu) appartient à la famille des Unikaryonidés, le genre *Nosema* (en vert) à celle des Nosématidés, et *Anncaliia* (en rose) à celle des Tubulinosematidés. *Anncaliia* fût classée initialement au sein du genre *Nosema* puis *Brachiola* (d'après Lifemap, NCBI version).

Après avoir testé plusieurs types cellulaires humains, et notamment des lignées intestinales humaines (Caco-2, HCT116, HT29 et i4047), j'ai donc choisi d'utiliser les cellules humaines HFF, dont la culture et la capacité d'infection par différentes espèces microsporidiennes sont maîtrisées au laboratoire. De plus, lorsque les cellules HFF atteignent le stade de confluence, les cellules cessent de proliférer. Ce processus complexe d'inhibition de contact est induit par l'action de protéines de jonctions cellulaires qui stoppent la division des cellules dès lors qu'elles communiquent les unes avec les autres. Ainsi, les cellules HFF offrent l'avantage de ne former qu'une seule couche cellulaire, facilitant leur infection mais aussi les observations microscopiques.

1.4. Mise en culture de *N. ceranae* : limiter l'apport de bactéries

Les spores de *N. ceranae* sont obtenues à partir d'intestin d'abeilles infectées, apportant avec elles un grand nombre de bactéries du microbiote intestinal. Il est donc nécessaire d'éliminer un maximum ces bactéries avant la mise en culture et de limiter leur développement.

Dans les études de Gisder et collaborateurs, les intestins des abeilles ont dans un premier temps été lavé au PBS afin d'éliminer un maximum de contenu intestinal. Ils ont ensuite réalisé une purification des spores basées sur l'utilisation d'un gradient de Percoll® (Gisder *et al.*, 2011).

Au laboratoire, pour purifier les spores de *N. ceranae* nous réalisons des centrifugations différentielles à partir de broyats d'intestins d'abeilles infectées pour éliminer un maximum de débris tissulaires et de bactéries, en vue notamment d'infecter de nouvelles abeilles pour les expérimentations *in vivo*. Pour les tests de culture *in vitro*, à partir de ces solutions, les spores de *N. ceranae* ont été incubées en présence d'un cocktail d'antibiotiques (gentamicine, pénicilline, streptomycine, ampicilline). Les spores ainsi purifiées ont été lavées et mises au contact de cellules HFF adhérentes. Ce protocole a permis d'observer un début de prolifération des parasites. Malheureusement, après plusieurs jours de culture, un avortement du cycle de développement au niveau de différents foyers parasitaires a été constaté et peu de spores étaient produites.

1.5. *Encephalitozoon cuniculi*, une alternative à *Nosema*

Aux vues des difficultés à obtenir un cycle complet et une production suffisante de spores de *N. ceranae* en culture cellulaire, j'ai choisi de m'orienter sur deux souches microsporidiennes, *Anncaliia algerae* et *Encephalitozoon cuniculi*, maintenues en culture sur des cellules HFF.

La microsporidie *A. algerae* est un parasite d'insectes et de mammifères, classée initialement au sein de la famille des *Nosematidae* avant d'être finalement affiliée à celle des *Tubulinosematidae* (Figure 49). Son cycle de développement est très proche de celui de *N. ceranae*, mais son étonnante capacité à se développer dans une large gamme de types cellulaires en culture fait de cette espèce un bon modèle d'étude. Initialement, je souhaitais donc comparer les effets d'*A. algerae* et d'*E. cuniculi*

(qui a la particularité de se développer dans une vacuole parasitophore) sur l'induction ou non de stress oxydant. Malheureusement suite à des contaminations dans les cultures d'*A. algerae* et contrainte par le temps, j'ai choisi de mener mon étude uniquement sur le modèle HFF/*E. cuniculi*.

2. Choix des protocoles expérimentaux

Dans le but de mieux comprendre l'interaction microsporidie/cellule hôte, et peut-être mieux appréhender les interactions *N. ceranae*/*A. mellifera* au travers d'un modèle simplifié, j'ai souhaité savoir si une infection microsporidienne perturbait l'homéostasie cellulaire en engendrant une augmentation du stress oxydant. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse qu'une infection par les microsporidies pourrait engendrer une augmentation du nombre de mitochondries et/ou de leur activité, générant ainsi une perturbation de la balance oxydante. De plus, pour savoir dans quelle mesure l'addition du fipronil pouvait perturber cette balance, en présence ou non du parasite, j'ai également fait le choix de co-exposer les cellules à *E. cuniculi* et au fipronil, mais aussi à un pro-oxydant, le peroxyde d'hydrogène et un antioxydant, l'acide ascorbique, couramment utilisés en culture cellulaire dans les études portant sur le stress oxydant. Je n'ai en effet pas conservé la N-acétylcystéine, les tests réalisés avec cet antioxydant étant peu concluants sur le modèle *E. cuniculi*/HFF.

Pour mesurer l'impact sur la viabilité cellulaire, j'ai utilisé le test du MTT (ou sel de tétrazolium), une méthode rapide et simple de numération des cellules viables. Le principe repose sur la réduction du MTT (de couleur jaune), *via* la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan (de couleur violette) qualifié de « cristaux de formazan » de par leur insolubilité. Les cristaux sont ensuite dissous à l'aide d'un solvant et l'homogénat coloré qui se forme est quantifié par spectrométrie. Ainsi, ce test rend compte, non seulement de la viabilité cellulaire, mais aussi de l'état métabolique de la cellule.

Parallèlement, j'ai utilisé la sonde fluorescente CM-H₂DCFDA, utilisée dans la première étude (Paris *et al.*, 2017), pour quantifier les ERO produites dans les cellules HFF. Afin de comparer la production d'ERO entre les différentes conditions expérimentales, nous avons rapporté la quantification des ERO en fonction de la quantité de cellules métaboliquement actives mesurée grâce au test MTT. En effet, bien que la concentration en cellules initialementensemencée dans les plaques soit connue, la quantité de cellules, qui plus est, actives, au moment des mesures est quant à elle indéterminée.

Enfin, j'ai utilisé la sonde mitochondriale CMTMRos (MitotTracker®) afin de savoir si les conditions expérimentales modifiaient l'activité mitochondriale des cellules. Cette sonde diffuse passivement au travers des membranes cellulaires et s'accumule dans les mitochondries actives. Après fixation des échantillons, nous avons pu observer les marquages au microscope à épifluorescence. Cependant,

confrontée à des difficultés d'ordre matériel pour la quantification du marquage, seules les observations au microscope ont pu être exploitées. Pour cela, j'ai utilisé le programme ImageJ, un logiciel de traitement et d'analyse d'images, qui m'a permis d'estimer la quantité de fluorescence à partir des champs d'observations photographiés. Ces tests étant préliminaires, seules 2 champs par conditions ont été analysés à ce jour. Davantage de mesures seront réalisées dans le but de consolider les résultats.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés sous-forme d'une prépublication. Ces données mériteront cependant d'être renforcées, dont la quantification de divers marqueurs du stress oxydant comme la mesure des activités d'enzymes antioxydantes.

Effect of the insecticide fipronil on oxidative status in human foreskin fibroblast cells infected with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*.

Laurianne Paris, Frédéric Delbac, Ivan Wawrzyniak, Marie Diogon*

Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE, F-63000 Clermont-Ferrand, France

* Corresponding author: marie.diogon@uca.fr

E-mail: Tel. (+33) 4 73 40 78 68. Fax. (+33) 4 73 40 76 70. Postal address: Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement - 1 Impasse Amélie Murat - TSA 60026 - CS 60026 - 63178 Aubière Cedex - France.

Abstract

Microsporidia are obligate intracellular parasites of diverse animal groups including mammals. They are highly dependent on energy produced by their host because they possess some relict mitochondria that have lost the ability to produce ATP. Mitochondria are well known to be an important source of reactive oxygen species (ROS) during oxidative phosphorylation. As microsporidia can hijack the host mitochondria metabolism, we hypothesized that infection of human foreskin fibroblast (HFF) cells by the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* may impact the amount of ROS generated by the host mitochondria. In addition, we exposed both uninfected and *E. cuniculi*-infected HFF cells to the insecticide fipronil, considered as a pro-oxidant molecule. We have compared the effect of fipronil to those induced by the hydrogen peroxide (H₂O₂) and the ascorbic acid characterized for their pro-oxidant and antioxidant properties, respectively. We evaluated the HFF cell viability using a MTT assay, measured the production of total ROS with a fluorescent probe (CM-H₂DCFDA), and quantified the active mitochondria in HFF cells after labelling using MitoTracker®Orange (CMTMRos). Our results revealed that *E. cuniculi* did not seem to modify the ROS concentration in HFF cells. In addition, no decrease in the amount of ROS was observed after treatment of cells with ascorbic acid. On the contrary, the addition of fipronil and H₂O₂ increased the oxidative status of uninfected cells, confirming that fipronil could act as a pro-oxidant. Finally, we also exposed *E. cuniculi*-infected cells to fipronil or H₂O₂. Interestingly, the

infection seemed to counteract the pro-oxidant effect of fipronil but not that of H₂O₂.

Introduction

Microsporidia are spore-forming obligate intracellular unicellular parasites closely related to fungi. With more than 1500 species currently described, they have been highlighted as ubiquitous pathogens, their wide host range covering almost the entire animal kingdom, from invertebrates to vertebrates (Corradi, 2015). In human, several species including *Encephalitozoon cuniculi* have been recognized as common opportunistic pathogens for immunocompromised patients.

E. cuniculi was described for the first time in 1923 in rabbits (Levaditi *et al.*, 1923), and is considered as a model species for the study of host-microsporidia interactions because this species is easily cultivated *in vitro* and its genome has been fully sequenced. As most microsporidian, *E. cuniculi* is characterized by a strong host dependency illustrated by an extensive gene loss and a genome compaction (Katinka *et al.*, 2001; Peyretailade *et al.*, 2009). *E. cuniculi* commonly parasitizes domestic rabbits, with a high prevalence (Künzel and Joachim, 2010; Neumayerová *et al.*, 2014; Maestrini *et al.*, 2017), but is also able to infect wild and domestic muridae, foxes (Meredith *et al.*, 2015), cats (Benz *et al.*, 2011; Künzel *et al.*, 2014; Tsukada *et al.*, 2016), dogs (Nell *et al.*, 2015), horses (Wagnerová *et al.*, 2012) and primates, including humans. In human, *E. cuniculi* is well known to cause digestive and neurological clinical

symptoms mainly in immunocompromised patients (Weber *et al.*, 1994).

Individual contamination occurs primarily through the fecal-oral route, by direct contact with a carrier or *via* a contaminated environment. A transplacental transmission has been also described in rabbits (Baneux and Pognan, 2003). After contact or ingestion of spores, the parasite can spread to the kidneys and to other parts of the body such as the liver, the lungs, and sometimes the heart. Ultimately, *E. cuniculi* can invade the brain and lead to permanent damages (Künzel and Joachim, 2010). Although the infection is generally asymptomatic, hosts can develop clinical symptoms like pulmonary, renal and urinary failure, ophthalmic disorders (Benz *et al.*, 2011), and sometimes neurological signs such as vestibular syndrome (torticollis, loss of balance, fall, uncontrolled ocular movements, tremors, paralysis of the hind limbs). Finally, disease can be fatal to the host, especially in animals or people with a very weakened immune system.

E. cuniculi can develop *in vitro* in several adherent mammal cells, such as Madin Darby canine kidney (MDCK), rabbit kidney (RK13) or human foreskin fibroblast (HFF). In the present study, we used HFF cells which are easy to grow, develop in a single layer until they reach confluency, and allow an efficient *E. cuniculi* infection and development.

Similarly to other *Encephalitozoon* species, *E. cuniculi* proliferates and differentiates within a parasitophorous vacuole inside host cells. The membrane of this intracellular compartment being derived from the host cell plasma membrane (Rönnebäumer *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2017).

Microsporidia are also characterized by the presence of relict mitochondria known as mitosomes. As these mitochondria-like organelles have lost the ability to produce ATP microsporidia are strongly dependent on their host for energy (Tsaousis *et al.*, 2008). A recruitment of host mitochondria surrounding the parasites during their proliferation is commonly observed and is probably required to facilitate the transfer of ATP (Hacker *et al.*, 2014). As microsporidia harvest ATP

from the host cell, *via* nucleotide transport (NTT) proteins located on the parasite cell surface (Tsaousis *et al.*, 2008; Heinz *et al.*, 2014) we hypothesized that it could induce an increase of the activity of mitochondrial respiratory chain complexes. However, mitochondria are known to generate reactive oxygen species (ROS) during the oxidative phosphorylation, predominantly from the complex I (NADPH-dehydrogenase) and the complex III (cytochrome-c oxidase) (Batty *et al.*, 2009). In this context, we aimed to determine whether *E. cuniculi* infection could increase the ROS production in HFF cells. We also assayed if the addition of a pro-oxidant, the hydrogen peroxide H₂O₂ or an antioxidant, the ascorbic acid, could aggravate or improve the effect of the microsporidian infection on the oxidative stress. Moreover, the ROS production can be modified by environmental factors like the presence of pesticides. HFF cells were thus exposed to fipronil, a commonly used insecticide belonging to the phenylpyrazole family that acts as a reversible inhibitor of the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor and glutamate-activated chloride channels (Tingle *et al.*, 2000). As fipronil has been demonstrated to act as a pro-oxidant molecule in cell culture (Ki *et al.*, 2012), we aimed to assess if the exposure of HFF cells to fipronil could affect both the oxidative stress in infected cells and the development of *E. cuniculi*.

Materials and Methods

Cell lines and culture conditions

Human foreskin fibroblast cells (HFF, American Type Culture Collection) were grown in Minimum Essential Medium (MEM). Medium was supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 2.5 µg/L amphotericin B, 100 µg/L penicillin/streptomycin and 100 µg/L ampicillin. Cells were grown in 75 cm² culture flasks, in a 5% CO₂ incubator at 37°C. For experiments, when they reach confluence, cells were dissociated using 0.05% trypsin-EDTA (Gibco®, ThermoFischer Scientific) and seeded in 96-well cell culture plates (Cellstar®, Greiner Bio-

One) at a density of 2.10^4 cells by well. Both the infection with *E. cuniculi* and/or the treatments with fipronil, H_2O_2 or ascorbic acid were done in 96-well cell culture plates.

Cell infection

E. cuniculi parasites were grown in HFF cell culture flasks. Supernatants were collected and spores were harvested at $5000 \times g$ for 5 min, washed, and stored in phosphate-buffered saline (PBS) at $4^\circ C$, as described previously (Delbac *et al.*, 1998). When HFF cells reach confluence in 96-well cell culture plates (48h after passaging), they were infected with 5.10^4 *E. cuniculi* spores/well. Plates were incubated 30 min at $37^\circ C$ and cells were then washed 3 times with 100 μL of PBS before exposure to fipronil, H_2O_2 or ascorbic acid.

MTT reduction assay

Reduction of the permeable tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di-phenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was monitored as described by Mosmann (Mosmann, 1983) with modifications. Cells seeded in 96-well culture plates and exposed 24, 48 and 120 hours to parasites and/or treatments were used for the assays. Twenty-two μL of filtered MTT (5 mg/mL in PBS) were added to the 200 μL of the medium and plates were incubated for 2 h at $37^\circ C$ with slight agitation in the dark. Metabolically active cells convert the yellow MTT tetrazolium compound to a purple formazan product. Then, the medium was discarded, 100 μL of mixed DMSO/isopropanol (1:1) were added to dissolve the insoluble formazan and incubated at RT for 5 min. Plates were read at 550 nm using a microplate reader (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Some wells were treated with a solution of 100% DMSO to determine the residual threshold, since these cells were considered as dead (the MTT reduction was every time ($n=8$) approximately $1.7 \pm 0.2\%$, in both uninfected and infected cells). The DMSO at 0.63% corresponded to the DMSO dose present in 100 μM of fipronil and decreased the activity of MTT reduction only after 48h of exposition. The DMSO concentrations

corresponding to the DMSO in the 0.5, 5 and 50 μM fipronil doses (0.003, 0.03 and 0.3%, respectively) were tested on HFF and did not have any effect on the MTT reduction (data not shown).

ROS quantification

The CM- H_2 DCFDA probe (Molecular Probes®, life technologies) useful for the detection of ROS was applied on cells at 24 and 48 hours after infection with *E. cuniculi* and/or chemical treatments. A stock solution was diluted at 200 μM in pure ethanol and conserved at $-20^\circ C$. The probe was then diluted in PBS to obtain a solution at 25 μM . Cells in 96-wells culture plates were washed with 100 μL of sterile PBS per well and 40 μL of the diluted probe were added in each well. Plates were incubated at $37^\circ C$ for 20 min in the dark, and the fluorescence was measured with the Fluoroskan Ascent FL (ThermoLabsystem) with λ_{ex} 485 nm and λ_{em} 538 nm.

Spore load quantification by ELISA

Parasite load quantification was done at 120 hours after infection with *E. cuniculi* in both untreated HFF cells and cells exposed to chemicals (Fipronil, H_2O_2 or ascorbic acid). One 96-well plate with uninfected HFF cells was used in order to measure the background signal, and one plate of *E. cuniculi*-infected HFF cells allowed to evaluate the parasitic growth. We used the ELISA assay previously described by Roussel *et al.* (Roussel *et al.*, 2015). Briefly, cells were fixed at $-80^\circ C$ for 20 min with methanol, saturated at $4^\circ C$ overnight in Tris 0.1M containing 2% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated with an anti-*E. cuniculi* rabbit serum (from naturally infected rabbits) diluted at $1/1000^{th}$ in antibody dilution buffer (Tris 10 mM; NaCl 0.15 M; BSA 0.2%, Tween 20 0.05%). Cells were washed 5 times with Tris 10 mM pH 7.4 containing 0.05% Tween 20 and an anti-rabbit antibody (Anti-Rabbit IgG AP Conjugate, Promega) was added at a dilution of $1/10000^{th}$ in antibody dilution buffer for 1h at $37^\circ C$. Cells were washed as previously and incubated at RT for 30 min in the dark in 10 mM of MUP prepared at $1/100^{th}$ in revelation buffer (Na_2CO_3 0.05 M pH 9.8; $MgCl_2$ 1

mM). Reaction was stopped by the addition of NaOH 3M and the fluorescence was measured using the Fluoroskan Ascent FL (Thermolabsystems) with λ_{ex} 355 nm and λ_{em} 460 nm. Spore load was deduced by subtracting the mean of fluorescence in uninfected cells to each infected cells treatment condition.

Active mitochondria labelling

The MitoTracker[®]Orange CMTMRos (Molecular Probes[®], Invitrogen) was applied on cells at 48 and 72 hours post-infection and fipronil treatment. This probe passively diffuses across the plasma membrane and accumulates into metabolically active mitochondria. By this way, it had permitted to visualize effect of chemical and/or biological treatments on mitochondrial activity by using epifluorescence microscope (Leica DM IRB) at λ_{ex} 515-560 nm and λ_{em} 590 nm. Cells were cultured on glass slides and treated as described above. The probe (0.5 μ M) was added in each well and incubated at 37°C for 45 min. Cells were washed 2 times with PBS, fixed with methanol during 15 min at -20°C and washed with PBS. Then, slides were incubated at RT for 10 min in the dark with 300 nM of DAPI. Slides were washed in PBS and mounted with 3 μ L of Prolong[®] Diamond Antifade (Fisher). The fluorescence was estimated with the ImageJ software (Fiji) after examination of 2 microscopic fields in each condition. Preparations were examined with a Leica epifluorescence microscope (DM IRB) (x 1000).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R 3.2.5 software (<https://cran.r-project.org/>). The error rate was set at $\alpha=0.05$. Results were presented as the mean \pm standard deviation (SD), according to statistical distribution. Mann-Whitney test was applied in order to compare uninfected and infected cells. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test coupled to the Benjamini-Hochberg correction was applied so as to compare the different conditions with the uninfected and untreated cells.

Results

Effect of *E. cuniculi*, fipronil, H₂O₂ and ascorbic acid on HFF cell viability

MTT reduction is an assay commonly used to measure the cell viability (Fotakis and Timbrell, 2006). So this assay was performed to evaluate the impact of the chemical treatments at different doses in both uninfected and *E. cuniculi*-infected HFF cells.

The MTT reduction was measured at 24, 48 and 120h, but only the results at 24 and 48h are presented in the **Figure 1**. At 120h hours, the only differences were observed for H₂O₂ at 100 μ M ascorbic acid at the two highest concentrations (250 and 500 μ M) (**Figure S1**).

Effect of fipronil

Four concentrations of fipronil ranging from 0.5 μ M to 100 μ M were tested. At 24h only the two highest doses were cytotoxic (68.7 \pm 1.7% viability at 50 μ M and 53.6 \pm 2.6% viability at 100 μ M) (**Figure 1A**). This effect was still noticeable only at 100 μ M 48h after the addition of fipronil (56.9 \pm 1.0% viability). On the contrary, an increase of the cell viability of approximately 53-62% is observed at 48h for the two lowest doses (0.5 and 5 μ M) (**Figure 1B**). We hypothesize that the increase of cell viability 48 h after the addition of fipronil might be due to a restart of cell multiplication once the pesticide had been degraded and/or detoxified.

Effect of H₂O₂

The H₂O₂ was tested at the same four doses than fipronil. Only the highest dose (100 μ M) led to a decrease of approximately 45% of the cell viability at 24h and 48h revealing a cytotoxic effect of H₂O₂ at this concentration. The lower doses did not reduced the cell viability (**Figure 1C and 1D**).

Effect of ascorbic acid

The addition of ascorbic acid seemed to strengthen the cell viability with a dose-dependent effect, significant from 100 to 500 μ M at the two time points (**Figures 1E and 1F**). The effect of 500 μ M of ascorbic acid was strongly accentuated at 48h as the cell viability was 10 times stronger when compared to the control.

Effect of E. cuniculi

At 24h the cell viability was significantly decreased by $23.6 \pm 2.8\%$ in infected cells compared to uninfected ones ($0 \mu\text{M}$, **Figure 1**). In contrast, the MTT reduction was significantly greater from $23.4 \pm 1.7\%$ in infected cells than uninfected HFF cells at 48h post-infection.

When the cells were infected and treated with fipronil the cell viability was significantly increased (0.5 and $5 \mu\text{M}$ at 24h, and 0.5 , 5 , and $50 \mu\text{M}$ at 48h) compared to the uninfected fipronil condition (**Figures 1A and 1B**).

The combination of H_2O_2 and *E. cuniculi* infection seemed to decrease significantly the MTT

reduction. A decrease of MTT reduction from 20 to 35% is observed for all doses at 24h and 48h, except for the $50 \mu\text{M}$ dose at 48h where the MTT reduction was unchanged compared to the uninfected cells treated with the same dose (**Figures 1C and 1D**).

Finally the addition of ascorbic acid in infected cells did not modify the MTT reduction compared to the condition with the treatment alone (except for $10 \mu\text{M}$ at 48h). As for uninfected cells the ascorbic acid treatment induced a strong increase of the cell viability (**Figures 1E and 1F**).

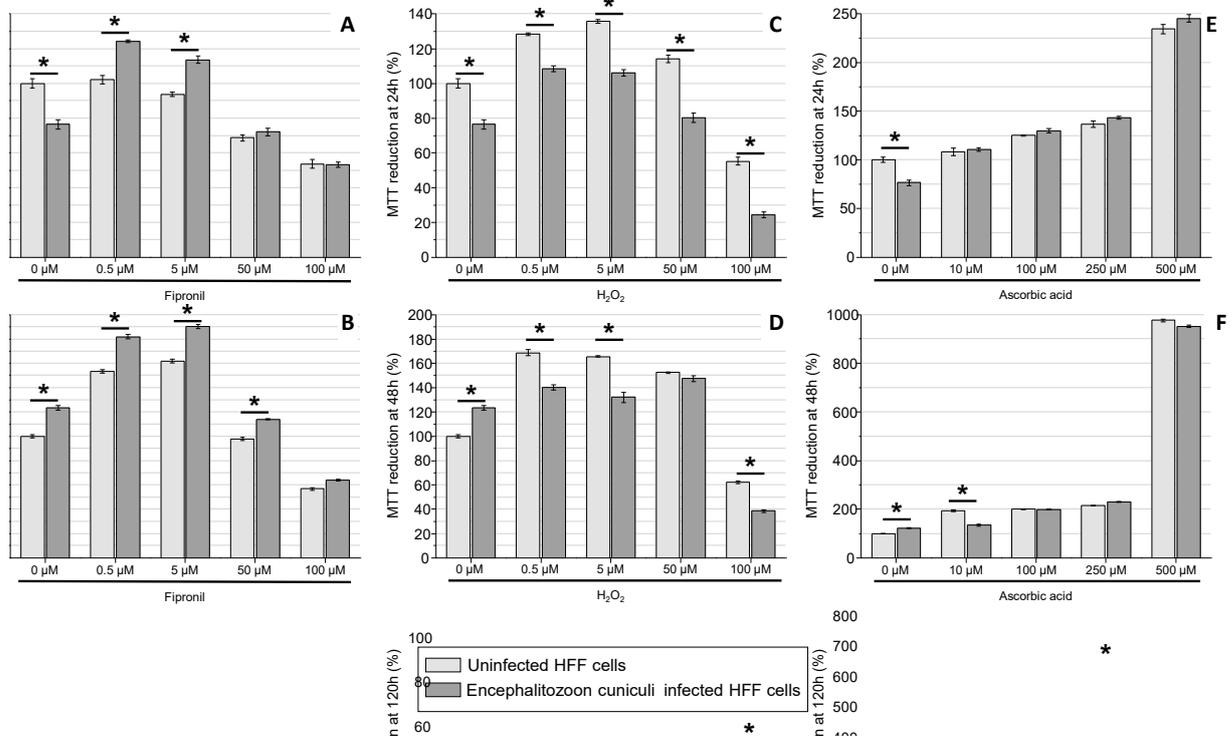


Figure 1. Effect of fipronil, H₂O₂ and ascorbic acid on the MTT reduction activity of uninfected and *E. cuniculi*-infected HFF cells. Cells were exposed to molecules at concentrations ranging from 0.5 to 100 μM for the fipronil (A-B) and H₂O₂ (C-D), and from 10 to 500 μM for ascorbic acid (E-F). Measures were realised at 24 (A, C, E), 48 (B, D, F) and 120 hours (see Figure S1) after the infection and the chemical exposure. Data correspond to means ± SD, n = 8. 100% activity on the y axis corresponds to MTT reduction activity of uninfected and untreated cells which represents the control condition (light grey bar at 0 μM). Asterisks indicate significant difference at p<0.05 between the uninfected and the uninfected group for each treatment condition.

Effect of *E. cuniculi*, fipronil, H₂O₂ and ascorbic acid on ROS concentration

ROS were measured using a fluorescent probe at 24 and 48h time points (**Figure 2**). To normalize the results, we established a ratio taking into account the ROS values but also the cell viability (MTT

reduction) which was highly variable from one treatment condition to another (ratio = % ROS measured/% MTT reduction) (**Figure 3**). The ratio for the uninfected and untreated condition (control condition) is 1, and corresponded to the ratio of 100% viability / 100% ROS concentration.

So, considering the MTT reduction assay, a decrease of the ratio indicated a decrease of ROS concentration and on the contrary an increase of this ratio revealed an oxidative stress compared to the control condition.

Effect of fipronil

At 24h after fipronil exposure, the ratio revealing the oxidative status of cells increased in a dose-dependent manner and reach 1.8 at 100 μ M of fipronil (**Figure 3A**). This result indicated that an oxidative stress occurred under fipronil exposure. Surprisingly, at 48h after fipronil exposure, the oxidative stress seemed to be controlled as the ratio varied only slightly compared to the control, it was 20-30% lower than the control from 0.5 to 50 μ M of fipronil and 20% higher at 100 μ M (**Figure 3B**).

Effect of H₂O₂

With H₂O₂ treatment, the ratio was equal or lower than control until a 50 μ M concentration at 24h (**Figure 3C**). However at the same time, with the highest concentration (100 μ M H₂O₂) the ratio reached 1.6. At 48h the same trend was observed with a lowering of the ratio for the 0.5, 5 and 50 μ M concentrations and an equal ratio for 100 μ M (**Figure 3D**). So compared to fipronil the H₂O₂ treatment induced an oxidative stress only at 24h at the highest concentration.

Effect of ascorbic acid

As expected, with the anti-oxidant acid ascorbic the ratio gradually decreased in a dose-dependent

manner (**Figure 3E and 3F**). The ratio was the same at the two time points (24 and 48h) of the experiment.

Effect of E. cuniculi

The infection did not seem to modify the oxidative status of the HFF cells as the ratio was only slightly increased at 24h and 48h (approximately 1.1 for infected compared to uninfected condition).

With the fipronil treatment the ratio was always lower at 24h in infected cells compared to uninfected ones whatever the concentration of fipronil used. This result suggests that the *E. cuniculi* infection could counteract the oxidative stress induced by fipronil. At 48h the ratio seemed equal between infected and uninfected cells treated with fipronil. Only a lowering was detected at the 0.5 μ M concentration (0.6 for infected and fipronil condition *versus* 0.8 for the fipronil condition).

The H₂O₂ treatment combined with *E. cuniculi* infection did not have the same effect on oxidative state. Indeed at 24h the ratio increased in infected cells in a dose-dependent manner and reach a value of 5 at 100 μ M. At 48h the increase was mostly noticeable at 100 μ M (1.6 for infected and H₂O₂ condition *versus* 1 for the H₂O₂ condition).

Finally with ascorbic acid treatment combined with infection the ratio was always lowered compared to the uninfected and untreated control and few modified between infected and uninfected acid ascorbic conditions.

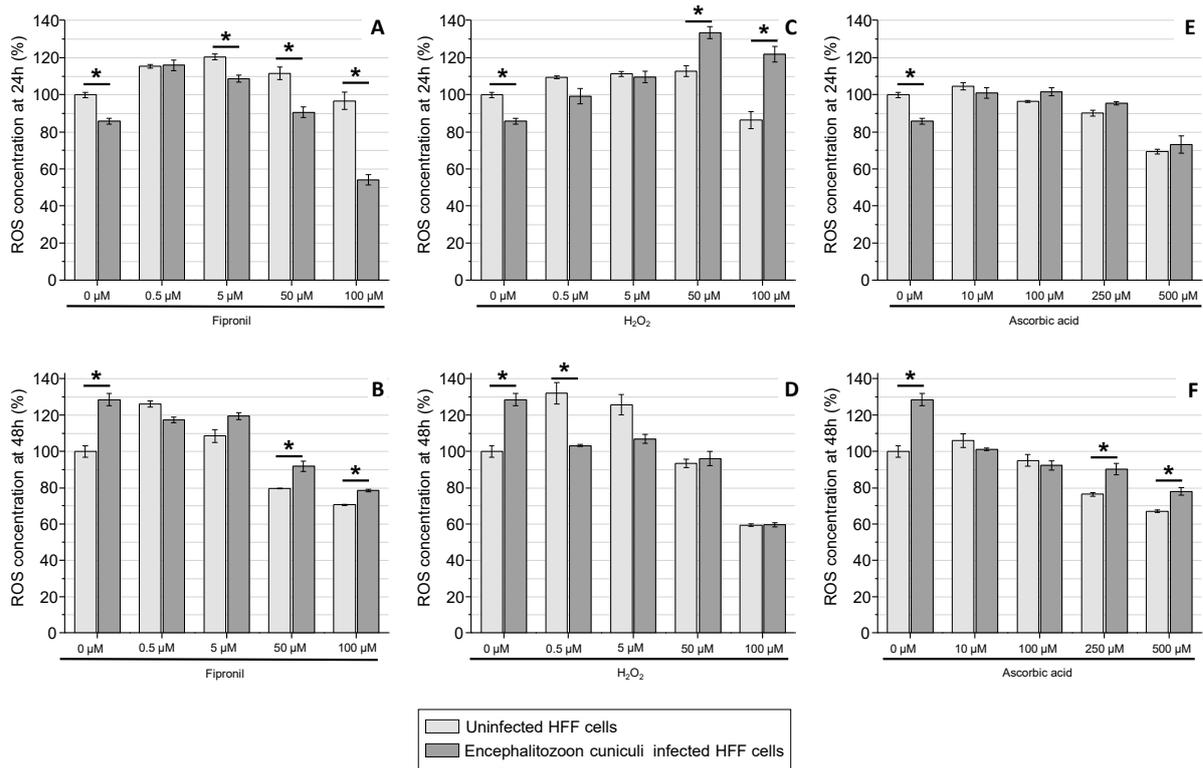


Figure 2. Effect of fipronil, H₂O₂ and ascorbic acid on the ROS production in both uninfected and *E. cuniculi*-infected HFF cells. Cells were exposed to treatments at concentrations ranging from 0.5 to 100 μM for the fipronil (A-B) and H₂O₂ (C-D), and from 10 to 500 μM of ascorbic acid (E-F). Measures were realised at 24 (A, C, E) and 48 hours (B, D, F) after the infection and/or the chemical exposure. 100% on the y axis corresponds to the ROS concentration of uninfected-untreated cells (light grey bar at 0 μM). Data correspond to means ± SD, n = 8. Asterisks indicate significant difference between the uninfected and the uninfected group for each treatment condition (p < 0.05).

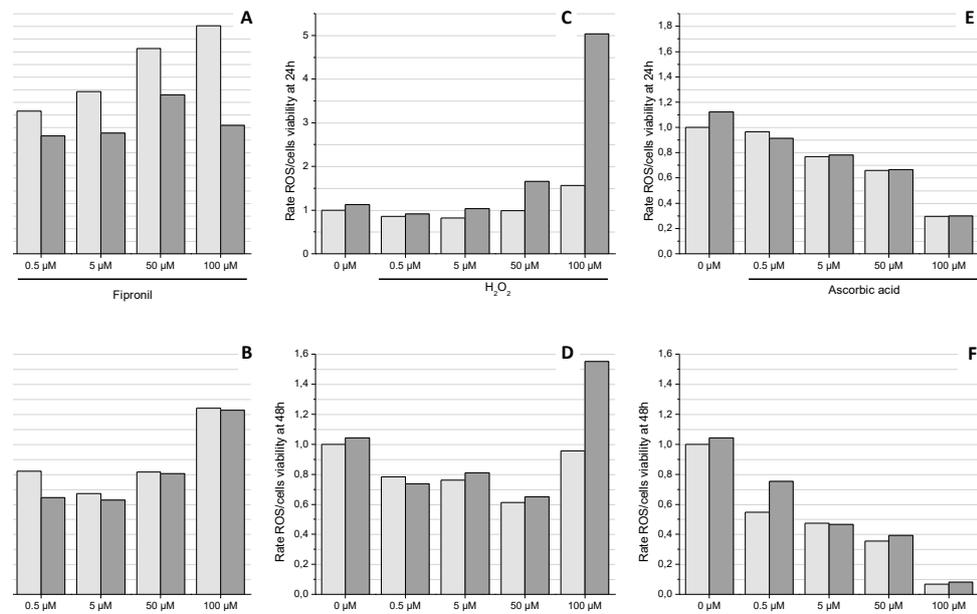


Figure 3. ROS production / cell viability ratio. The percentage of ROS was divided by the percentage of the MTT reduction activity in each experimental condition in order to normalize the data. The ratio equal to 1 on the y axis corresponds to the ROS rate of uninfected and untreated viable cells (light grey bar at 0 μM).

***E. cuniculi* development**

The spore load was measured in all infected conditions. We could observe a diminution of spore amount, with 50 and 100 μM of the pesticide with a diminution of 27.2 and 38.3%, respectively. Surprisingly, the spore load was gradually increased with the H_2O_2 concentration and was

significant at 100 μM (20% of supplementary spores). The ascorbic acid on the other hand, decreased the production of spores from 10 to 250 μM at around $11.8 \pm 0.8\%$, compared to untreated infected cells. However, with 500 μM of ascorbic acid, 14.6% more spores were detected with the ELISA test.

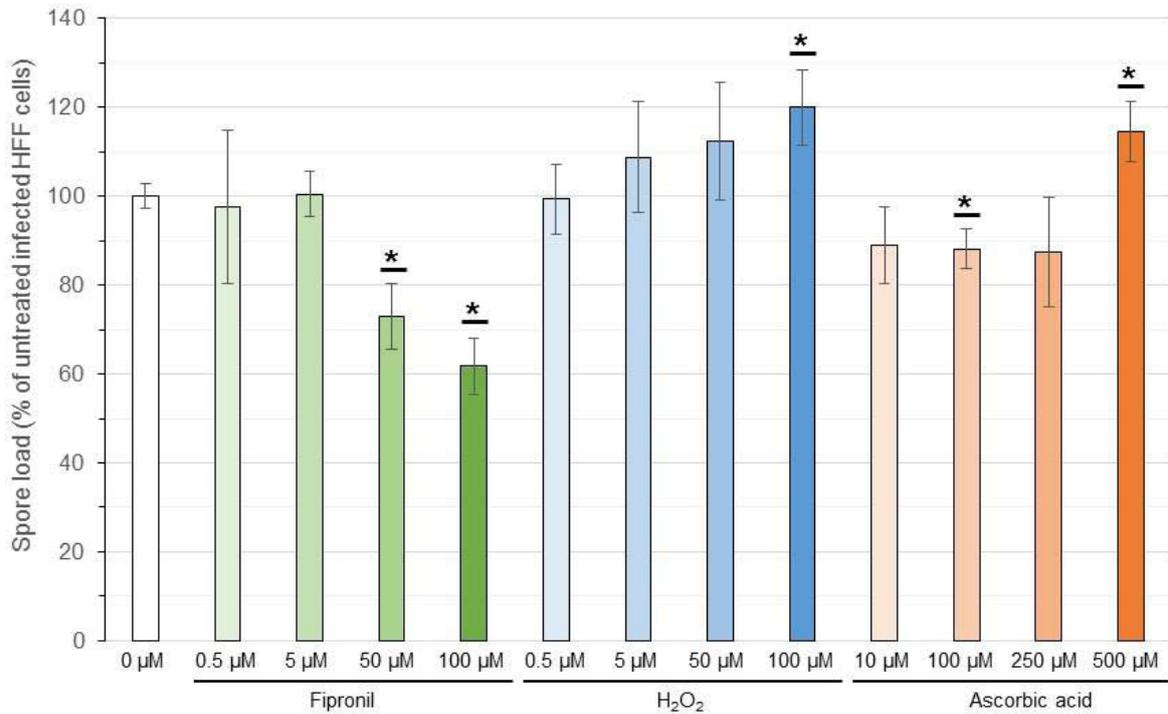


Figure 4. *E. cuniculi* spore load measured in different treatment conditions by ELISA. Infected HFF cells were exposed to different concentrations of fipronil (green), H_2O_2 (blue) and ascorbic acid (orange). The spore load was evaluated 120h post-infection and chemical exposure. 100% activity on the y axis represents the parasite proliferation in untreated HFF cells. Data correspond to means \pm SD, n = 8. Asterisks indicate significant difference between the untreated infected cells (0 μM) and each infected treatment condition ($p < 0.05$).

Active mitochondria estimation 72h after infection with *E. cuniculi* and/or fipronil treatment

A fluorescent probe (CMTMRos MitoTracker[®]) was used to visualize active mitochondria upon the infection and the pesticide treatment. ImageJ (Fiji) software was then applied to evaluate the intensity of the emitted fluorescence. The emitted

fluorescence revealing active mitochondria was increased in infected cells compared to uninfected cells, particularly in untreated condition (approximately 8-fold more activity). Indeed, the addition of fipronil in uninfected cells seemed multiply by a factor of 3 and 5 the mitochondria activity with 0.5 and 5 μM , respectively (**Figure 4**).

Figure 5. Estimation of active mitochondria in HFF cells. Both uninfected and infected HFF cells were treated with 0.5 or 5 μ M of fipronil. Active mitochondria were revealed with the CMTMRos MitoTracker[®] probe and the fluorescence was estimated with ImageJ (Fiji) software on 2 optical fields by slide, 72h after infection and chemical exposure.

Discussion

In this study, we have shown that the intracellular microsporidian parasite *E. cuniculi* could modulate the oxidative status in human cells upon chemical exposures.

In vitro cellular models have proven to be convenient tools to study several biological processes such as host-parasite-interactions and to assess the cytotoxic potential of pesticides. However, research exploring the effects of a combined exposition of cells with chemical treatments and parasite infection are rather limited. In our study, we used human foreskin fibroblasts as cell model to assess the effect of both infection by *E. cuniculi* and exposure to the insecticide fipronil, the pro-oxidant H₂O₂ and the antioxidant ascorbic acid. HFF cells are easily cultivated *in vitro* and frequently used for their infection by some microsporidian species including *E. cuniculi*.

Effect of a microsporidian infection on the oxidative status and metabolic activity of host cell mitochondria

Our results suggested that the development of *E. cuniculi* did not seem to increase the oxidative status of HFF cells.

Moreover, although the number of active mitochondria quantification is only exploratory in this study, and requires further investigations, our preliminary results seemed to show that the number of active mitochondria was greater in the *E. cuniculi*-infected HFF cells.

For a precise quantification, it would be possible to use flow cytometry in order to know precisely the number of active mitochondria in each cell, by using the same MitoTracker[®] probe. Nevertheless, with these two methods, it is impossible to conclude if an increase of the fluorescence is the result of an increase of the mitochondria number or/and an increase of their activity. However, a previous study has shown that an *Encephalitozoon* infection did not induce an increase of the mitochondrial volume, and the organelles seemed to form a single layer around the parasitophorous vacuole, whose the volume increased during parasite proliferation, thus increasing the area of contact with the mitochondria (Scanlon *et al.*, 2004; Hacker *et al.*, 2014).

Thus even if active mitochondria seemed to be increased during infection in our experiment, it did not induce any oxidative stress. This data agrees with previous studies on microsporidia that have

shown that the oxidative status was not increased and even more reduced in both the honeybee *Apis mellifera* and the wax moth *Galleria mellonella* infected with the microsporidian species *Nosema ceranae* (Paris *et al.*, 2017) and *Vairimorpha ephestiae* (Lozinskaia *et al.*, 2004), respectively. In the two models it was demonstrated that the activity of the antioxidant enzyme GST was increased during infection (Lozinskaia *et al.*, 2004; Vidau *et al.*, 2011a). It would be interesting to measure the activities of antioxidant enzymes (GST, SOD) in order to know if they are also increased during *E. cuniculi* infection.

Effect of the *E. cuniculi*-fipronil combination on oxidative status and active mitochondria

The fipronil-intoxication of uninfected cells has a negative impact on the cell survival as the increase of fipronil concentration induced a decrease of MTT reduction (**Figure 1A**). This result matches with MTT test results obtained in other cells models (Vidau *et al.*, 2011b; Romero *et al.*, 2016). This decline of the survival could also explain the decrease of the spore load with the two highest doses of fipronil (50 and 100 μ M). Indeed, microscopy observations have shown smaller and less foci in infected cells treated with these two doses than infected cells treated with 0.5 and 5 μ M of fipronil (data not shown). At 24h after exposure to Fipronil, the oxidative status was less important in infected- cells than uninfected cells, and surprisingly mitochondria seemed to be more active at least for the lowest concentration (0.5 and 5 μ M).

Using Caco-2 cell model, Vidau *et al.* showed that high concentrations of fipronil (from 50 to 200 μ M), triggered cell death and seemed to interact negatively with the mitochondria (Vidau *et al.*, 2009). Another study, using neuronal cells SH-SY5Y, permitted to refine these findings and demonstrated that fipronil acted as an uncoupler of the oxidative phosphorylation and led to the mitochondrial activity collapse (Vidau *et al.*, 2011b). Microscopic observation of HFF cells and MTT reduction activity assays indicated that fipronil had cytotoxic effects on HFF cells similarly

to these two cell models described above, and seemed to induce an accumulation of ROS in HFF in a dose-dependent manner. Considering the cytotoxic effect of fipronil at 50 and 100 μ M the decreased of ROS concentration at these doses has to be taken carefully. These results seemed to correlate with results obtained with SH-SY5Y cell line where the fipronil seemed to increase ROS generation (Ki *et al.*, 2012).

Previous studies revealed that the addition of the antioxidant N-acetylcysteine in cells treated with fipronil attenuated both the apoptotic cell death and the ROS production (Ki *et al.*, 2012), possibly due to the setting off the autophagy pathway (Park *et al.*, 2013). Indeed, autophagy is one of defence lines against oxidative stress damage. The autophagy pathway can be induced and up-regulated in response to intracellular ROS. Exposure of SH-SY5Y cells to fipronil led to the production of ROS. Treatment with N-acetylcysteine effectively blocked both apoptosis and autophagy of cells treated with 100 μ M of fipronil, and the pre-treatment with rapamycin, an autophagy inducer, enhanced the viability of fipronil-exposed cells (Park *et al.*, 2013). In our study, we used the antioxidant ascorbic acid, but not on the fipronil-treated cells. Ours results suggested that high concentrations of the antioxidant ascorbic acid improved the cell viability, compared to fipronil or H₂O₂. It would allow to maintain a regular ROS rate between uninfected and infected-treated cells. However, Park *et al.* did not show any effect of ascorbic acid in preventing of the oxidative stress caused by fipronil on neuronal cells (Park *et al.*, 2013).

While we observed a similar effect of fipronil and H₂O₂ on uninfected cells viability with an increase of the viability at low doses (0.5 and 5 μ M), we were surprised by the effect on infected cells. Indeed, despite the fact that fipronil was considered as a pro-oxidant (Ki *et al.*, 2012), we did not observed the same effect on the cell viability than the H₂O₂. Indeed, the fipronil treatment effect was superior on infected cells compared to uninfected cells, while it was the opposite which was observed with H₂O₂.

Effect of the *E. cuniculi*-H₂O₂ combination on the of host cell viability and their oxidative status

Surprisingly, we observed a positive effect of H₂O₂ on the spore amount production. One possible explanation is that hydrogen peroxide is known to trigger spore germination, a process required for host cell invasion by Microsporidia to deliver the sporoplasm within the host cytoplasm through the extruded polar tube (Leitch *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 2004). It can be hypothesized that the addition of hydrogen peroxide in the medium during our experiments would stimulate the germination of *E. cuniculi* spores and favor infection of neighboring cells.

Han *et al.* observed a decrease of 40% in cell viability after exposure of SH-SY5Y cells to 100 µM of H₂O₂ (Han *et al.*, 2014). We approximatively obtained the same percentage at this dose at 24 and 48h after exposure, and 55% of cell death at 120h in uninfected HFF cells. In *E. cuniculi*-infected cells, the cell viability was decreased in all concentrations of H₂O₂ at 24 and 48h (except for the 50 µM concentration at 48h).

The oxidative status increased in infected cells at 50 and 100 µM of H₂O₂ at 24h and at 100µM at 48h in the opposite to the results obtained with fipronil.

It was possible that the cells compensated the effect of the disruption of the oxidative balance induced by the *E.cuniculi*-Fipronil combination. This negative effect could not be assumed by host cells and the ROS production would not be controlled in presence of H₂O₂ at high concentration (50-100 µM) and *E. cuniculi*. Our results indicate that even if fipronil and H₂O₂ are pro-oxidant molecules they led to an opposite effect on the oxidative status in *E. cuniculi*-infected HFF cells.

This result is probably due to the fact that fipronil and H₂O₂ detoxification requires different enzymatic systems. H₂O₂ is mainly detoxified by catalase, or through peroxiredoxin or glutathione antioxidant system (Patel *et al.*, 2014). Fipronil is converted into sulfone metabolites by cytochrome P450 monooxygenase and then supported by GST

based metabolism (Scharf *et al.*, 2000). As the oxidative status is increased by a high dose of H₂O₂ and not by fipronil in presence of *E. cuniculi*, we hypothesized that the development of the parasite might interfere with the detoxification process of H₂O₂. This could occur (i) by competition (the parasite development and H₂O₂ detoxification require the same antioxidant system), (ii) by a blocking by the parasite of the antioxidant system used to detoxify H₂O₂, or (iii) by a gain of production of H₂O₂ by the cell during the infection leading to reach an unmanageable threshold.

To conclude, our work agreed with previous studies which have demonstrated the pro-oxidant effect of fipronil (Vidau *et al.*, 2011b; Ki *et al.*, 2012). Nevertheless, fipronil combined with *E. cuniculi* infection did not increase the oxidative stress and even more reduced it.

References

- Baneux, P.J.R. and Pognan, F. (2003) In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab. Anim.* **37**: 132–138.
- Batty, E., Jensen, K., and Freemont, P. (2009) PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **14**: 1182–96.
- Benz, P., Maaß, G., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Tichy, A., and Nell, B. (2011) Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Vet. Ophthalmol.* **14**: 37–47.
- Corradi, N. (2015) Microsporidia: Eukaryotic Intracellular Parasites Shaped by Gene Loss and Horizontal Gene Transfers. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**: 167–183.
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A., and Vivarès, C.P. (1998) On proteins of the microsporidian invasive apparatus: Complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.* **29**: 825–834.
- Fotakis, G. and Timbrell, J.A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* **160**: 171–

- 177.
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., and Lucocq, J. (2014) Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cell. Microbiol.* **16**: 565–579.
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P.M., Cali, A., et al. (2017) The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathog.* **13**: e1006341.
- Han, S.M., Kim, J.M., Park, K.K., Chang, Y.C., and Pak, S.C. (2014) Neuroprotective effects of melittin on hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **14**: 286.
- Heinz, E., Hacker, C., Dean, P., Mifsud, J., Goldberg, A. V., Williams, T.A., et al. (2014) Plasma Membrane-Located Purine Nucleotide Transport Proteins Are Key Components for Host Exploitation by Microsporidian Intracellular Parasites. *PLoS Pathog.* **10**: e1004547.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., et al. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**: 450–453.
- Ki, Y.-W., Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., and Koh, H.C. (2012) Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol. Lett.* **211**: 18–28.
- Künzel, F. and Joachim, A. (2010) *Encephalitozoonosis* in rabbits. *Parasitol. Res.* **106**: 299 – 309.
- Künzel, F., Peschke, R., Tichy, A., and Joachim, A. (2014) Comparison of an indirect fluorescent antibody test with Western blot for the detection of serum antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in cats. *Parasitol. Res.* **113**: 4457–4462.
- Leitch, G.J., He, Q., Wallace, S., and Visvesvara, G.S. (1993) Inhibition of the Spore Polar Filament Extrusion of the Microsporidium, *Encephalitozoon hellem*, Isolated from an AIDS Patient. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 711–717.
- Levaditi, C., Nicolau, S., and Schoen, R. (1923) L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *Comptes Rendus l'Académie des Sci.* **89**: 985–988.
- Lozinskaia, Y.L., Slepneva, I., Khramtsov, V. V, and Glupov, V. V (2004) Change of the antioxidant status and free radicals production in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae in microsporidiosis. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **40**: 99–103.
- Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., et al. (2017) *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **50**: 54–57.
- Meredith, A.L., Cleaveland, S.C., Brown, J., Mahajan, A., and Shaw, D.J. (2015) Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Wild Rodents, Foxes and Domestic Cats in Three Sites in the United Kingdom. *Transbound. Emerg. Dis.* **62**: 148–156.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63.
- Nell, B., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., and Maaß, G. (2015) *Encephalitozoon cuniculi* causes focal anterior cataract and uveitis in dogs. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K Kleintiere / Heimtiere* **43**: 337–344.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařík, K., et al. (2014) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Vet. Parasitol.* **204**: 184–190.
- Paris, L., Roussel, M., Pereira, B., Delbac, F., and 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.*
- Park, J.H., Lee, J.E., Lee, S.-J., Park, S.J., Park, K.H., Jeong, M., and Koh, H.C. (2013) Potential autophagy enhancers protect against fipronil-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicol. Lett.* **223**: 25–34.
- Patel, S.A., Velingkaar, N.S., and Kondratov, R. V (2014) Transcriptional Control of Antioxidant Defense by the Circadian Clock. *Antioxid. Redox Signal.* **20**: 2997–3007.

- Peyretailade, E., Gonçalves, O., Terrat, S., Dugat-Bony, E., Wincker, P., Cornman, R.S., et al. (2009) Identification of transcriptional signals in *Encephalitozoon cuniculi* widespread among Microsporidia phylum: support for accurate structural genome annotation. *BMC Genomics* **10**: 1–13.
- Romero, A., Ramos, E., Ares, I., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., et al. (2016) Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicol. Lett.* **252**: 42–49.
- Rönnebäumer, K., Gross, U., and Bohne, W. (2008) The Nascent Parasitophorous Vacuole Membrane of *Encephalitozoon cuniculi* Is Formed by Host Cell Lipids and Contains Pores Which Allow Nutrient Uptake. *Eukaryotic Cell* **7**: 1001–1009.
- Roussel, M., Villay, a, Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., et al. (2015) Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr. Polym.* **133**: 213–220.
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S., and Shaw, A.P. (2004) Relationship between the Host Cell Mitochondria and the Parasitophorous Vacuole in Cells Infected with *Encephalitozoon* Microsporidia. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**: 81–87.
- Scharf, M.E., Siegfried, B.D., Meinke, L.J., and Chandler, L.D. (2000) Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate- and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. *Pest Manag. Sci.* **56**: 757–766.
- Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., and King, W.J. (2000) Health and environmental effects of fipronil. *Pestic. Action Netw. UK briefing paper A11*: 1–30.
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A. V, Lucocq, J.M., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**: 553–557.
- Tsukada, R., Osaka, Y., Takano, T., Sasaki, M., Inose, M., and Ikadai, H. (2016) Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in cats in Japan. *Parasitology* **78**: 1615–1617.
- Vidau, C., Brunet, J.-L., Badiou, A., and Belzunces, L.P. (2009) Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol. In Vitro* **23**: 589–97.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., et al. (2011a) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* **6**: e21550.
- Vidau, C., González-Polo, R. a, Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J.M., Pizarro-Estrella, E., et al. (2011b) Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* **32**: 935–43.
- Wagnerová, P., Sak, B., Květ Nová, D., Natová, Z.B., Civišová, H., Maršálek, M., and Kváč, M. (2012) *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* **190**: 573–577.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., and Owen, R.L. (1994) Human Microsporidian Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 426–461.
- Xu, Y., Takvorian, P.M., Cali, A., Orr, G., and Weiss, L.M. (2004) Glycosylation of the Major Polar Tube Protein of *Encephalitozoon hellem*, a Microsporidian Parasite That Infects Humans. *Infect. Immun.*

Supplementary data

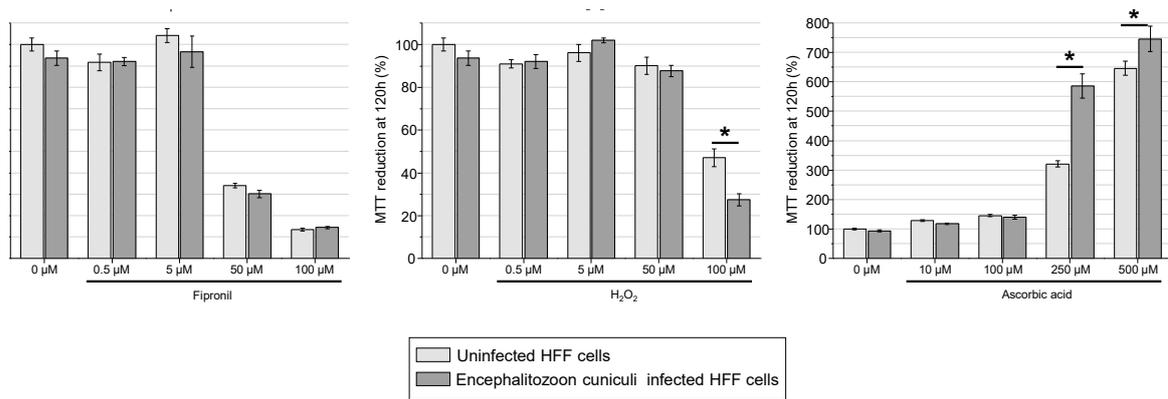


Figure S1. Effect of fipronil, H₂O₂ and ascorbic acid on the MTT reduction activity of both uninfected and *E. cuniculi*-infected HFF cells at 120h after infection and/or treatments. Cells were exposed to molecules at concentrations ranging from 0.5 to 100 μM for fipronil (Left) and H₂O₂ (Middle), and from 10 to 500 μM for ascorbic acid (Right). Measures were realised 120 hours after the infection and the treatment exposition. Data correspond to means ± SD, n = 8. 100% activity on the y axis corresponds to MTT reduction activity of uninfected-untreated cells which represents the control condition (light grey bar at 0 μM). Asterisks indicate significant difference between the uninfected and the uninfected group for each treatment condition (p<0.05).

Chapitre 4 : Effet conjoint de *Nosema ceranae* et de pesticides sur la composition du microbiote intestinal de l'abeille

*« N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès.
Essayez de devenir un homme qui a de la valeur. »*

Albert Einstein

Comme chez l'Homme, chez les abeilles les microorganismes font partie intégrante de leur développement. Ils sont présents en divers endroits de leur corps tels que la cuticule, les muqueuses trachéales ou encore la lumière intestinale. Ces communautés microbiennes peuvent aider l'hôte à se développer, se reproduire et à activer son métabolisme, mais aussi, elles lui permettent de se défendre contre d'éventuels agents pathogènes en formant une barrière protectrice et en stimulant son système immunitaire. Le microbiote est ainsi parfois considéré comme un organe à part entière.

Les communautés microbiennes de l'intestin, qui comprennent des bactéries, des archées et des eucaryotes, sont connues pour avoir une influence sur le bien-être de l'organisme. En effet, le microbiote intestinal joue un rôle prépondérant dans la digestion des aliments, la synthèse de vitamines, la défense contre les agents pathogènes et la stimulation du système immunitaire intestinal (Lozupone *et al.*, 2012). La structure des communautés, l'organisation spatiale et le fonctionnement de cette niche écologique, en constante évolution, peuvent être perturbés par de nombreux facteurs, exogènes ou endogènes. Chez l'Homme, trois grands *phyla*, rassemblant plusieurs classes et genres bactériens sont présents : les Actinobactéries, les Bactéroïdètes et les Firmicutes. Plusieurs études ont montré des perturbations du microbiote intestinal lors de certaines maladies. En effet, il a été montré qu'une dysbiose intestinale, avec notamment une diminution des Firmicutes, était associée à la maladie de Crohn qui est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin dont l'origine n'est pas encore clairement identifiée. La perturbation du microbiote semble également être en lien étroit avec d'autres troubles tels que le syndrome de l'intestin irritable, la rectocolite hémorragique mais aussi l'obésité, des troubles cardiovasculaires et les diabètes de types I et II (Doré & Corthier, 2010). Des troubles nerveux et psychiatriques sont mêmes suspectés d'être en lien avec une dysbiose intestinale (Fond *et al.*, 2016). Cependant, bien que le déséquilibre du microbiote soit constaté dans ces différentes maladies, le lien entre dysbiose et apparition de la maladie n'est pas encore clairement établi, la dysbiose semblant davantage être une conséquence (Barbut & Joly, 2010; Doré & Corthier, 2010). Outre les maladies, les traitements antibiotiques entraînent de fortes perturbations du microbiote intestinal, dont la capacité de résilience varie d'un individu à l'autre et peut même être incomplète à long terme (Becattini *et al.*, 2016).

Chez les abeilles, plusieurs études ont décrit le microbiote intestinal (Engel *et al.*, 2012; Horton *et al.*, 2015; Kwong & Moran, 2016), chez les différentes souches et castes d'abeilles (Ahn *et al.*, 2012), chez les ouvrières du stade larvaire au stade de butineuse (Ahn *et al.*, 2012; Kakumanu *et al.*, 2016), ou encore chez les abeilles d'été et d'hiver (Ludvigsen *et al.*, 2015). La perturbation du microbiote intestinal des abeilles a été soulevée notamment dans le cadre de pertes de colonies, et bien qu'un lien avec la présence de virus ou de *Varroa* soit suspectée, il est important de mieux cerner l'impact des agents pathogènes sur le microbiote (Hamdi *et al.*, 2011). De plus, l'utilisation d'antibiotiques étant interdite dans de nombreux pays européens en apiculture, l'impact de molécules exogènes sur le

Tableau 9. Résumé des principales fonctions du microbiote intestinal de l'abeille. Ce tableau est un résumé issu et traduit de l'article d'Alberoni *et al.* (2016) dans lequel les auteurs ont analysé l'ensemble des données disponibles dans la bibliographie.

Fonction générique du microbiote intestinal	Fonction spécifique	Microorganismes cibles identifiés
Soutien nutritionnel	Source de vitamines, d'acides gras et d'acides aminés	
	Dégradation de la lignine	<i>Fructobacillus</i> spp.
	Absorption des sucres	<i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i>
	Répartition des macromolécules végétales	
	Dégradation de la pectine	<i>Gilliamella apicola</i>
	Oxydation aérobie des produits finaux issus de la fermentation	<i>Snodgrassella alvi</i>
	Activités glycoside hydrolase	Bactéries lactiques
	Dégradation du tréhalose	<i>Bifidobacterium</i> spp.
Stimulation directe du système immunitaire de l'abeille	Augmentation du taux d'expression de peptides antimicrobiens (PAM) en présence d'agents pathogènes chez les larves	
	Augmentation du taux d'expression des PAM sélectionnés chez les larves d'abeille lors de l'alimentation avec des bactéries probiotiques	
	Forte corrélation positive entre la quantité totale de bactéries de l'intestin d'abeille et les niveaux de transcription des PAM	
Protection de l'hôte	Activité antimicrobienne contre <i>Paenibacillus larvae</i> , <i>Melissococcus plutonius</i> et <i>Ascosphaera apis</i>	<i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.
	Formation de biofilm et structures ressemblant à des substances polymériques extracellulaires	Bactéries lactiques
	Biosynthèse des exopolysaccharides des parois cellulaires	<i>Firmicutes 4</i> et <i>Bifidobacteriaceae</i>
	Gènes codant un grand nombre de fonctions liées à la formation de biofilms et aux interactions avec l'hôte (pili de type IV, protéines de la membrane externe, sécrétion)	<i>Gilliamella apicola</i> et <i>Snodgrassella alvi</i>

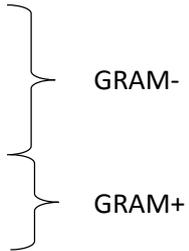
microbiote semble davantage être d'origine chimique dans ces pays. La part de responsabilité des pathogènes et des polluants dans cette perturbation reste encore à élucider (Engel *et al.*, 2016).

Il est également à noter que le microbiote intestinal des abeilles, comme chez l'Homme et d'autres organismes, évolue au cours du développement de l'individu en succession microbienne, subissant un contrôle génétique et environnemental (apports nutritifs (Corby-Harris *et al.*, 2014), présences de probiotiques ou de traitements antibiotiques (Raymann *et al.*, 2017) et chimiques (Engel *et al.*, 2016; Kakumanu *et al.*, 2016)) constant.

1. Le microbiote intestinal de l'abeille

Les recherches portant sur le microbiote intestinal de l'abeille sont en plein essor depuis une dizaine d'années. Différentes études ont permis de décrire le rôle de cette flore intestinale. Elles ont notamment montré que le microbiote pouvait contribuer, en plus de son implication dans le processus de digestion et la synthèse de nutriments essentiels (*e.g* : vitamines, acides gras et acides aminés), à la défense de l'organisme contre les agents pathogènes en formant un biofilm protecteur ou en stimulant la réponse immunitaire de l'hôte, mais aussi à la détoxification de divers polluants (Engel & Moran, 2013; Kwong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015a) (Tableau 9).

Contrairement à d'autres espèces animales, le microbiote intestinal de l'abeille est caractérisé par une faible diversité des communautés bactériennes (Sabree *et al.*, 2012). Le microbiote « core », c'est-à-dire le microbiote conservé entre l'ensemble des individus, représente 95% des espèces bactériennes du microbiote et est constitué de seulement 9 espèces distribuées dans 5 classes ou *phyla* :

- les Alphaprotéobactéries (*Alpha-1*, *Alpha-2.1* et *Alpha-2.2*)
 - les β -protéobactéries (*Neisseriales* : *Snodgrassella alvi*)
 - les γ -protéobactéries (*Orbales* : *Gilliamella apicola* et *Friscella perrara*)
 - les Actinobactéries (*Bifidobacterium asteroides*)
 - les Firmicutes (*Lactobacillaceae* : *Firm-4* et *Firm-5*)
- 

La répartition du microbiote intestinal le long du tractus digestif des abeilles ouvrières, ainsi que son évolution au cours du développement larvaire et de la vie adulte sont décrites dans les Figures 50 et 51 (d'après Kwong et Moran, 2016). Les voies de transmission ainsi que les principales espèces présentes chez les reines et les mâles sont également détaillées (Figure 51).

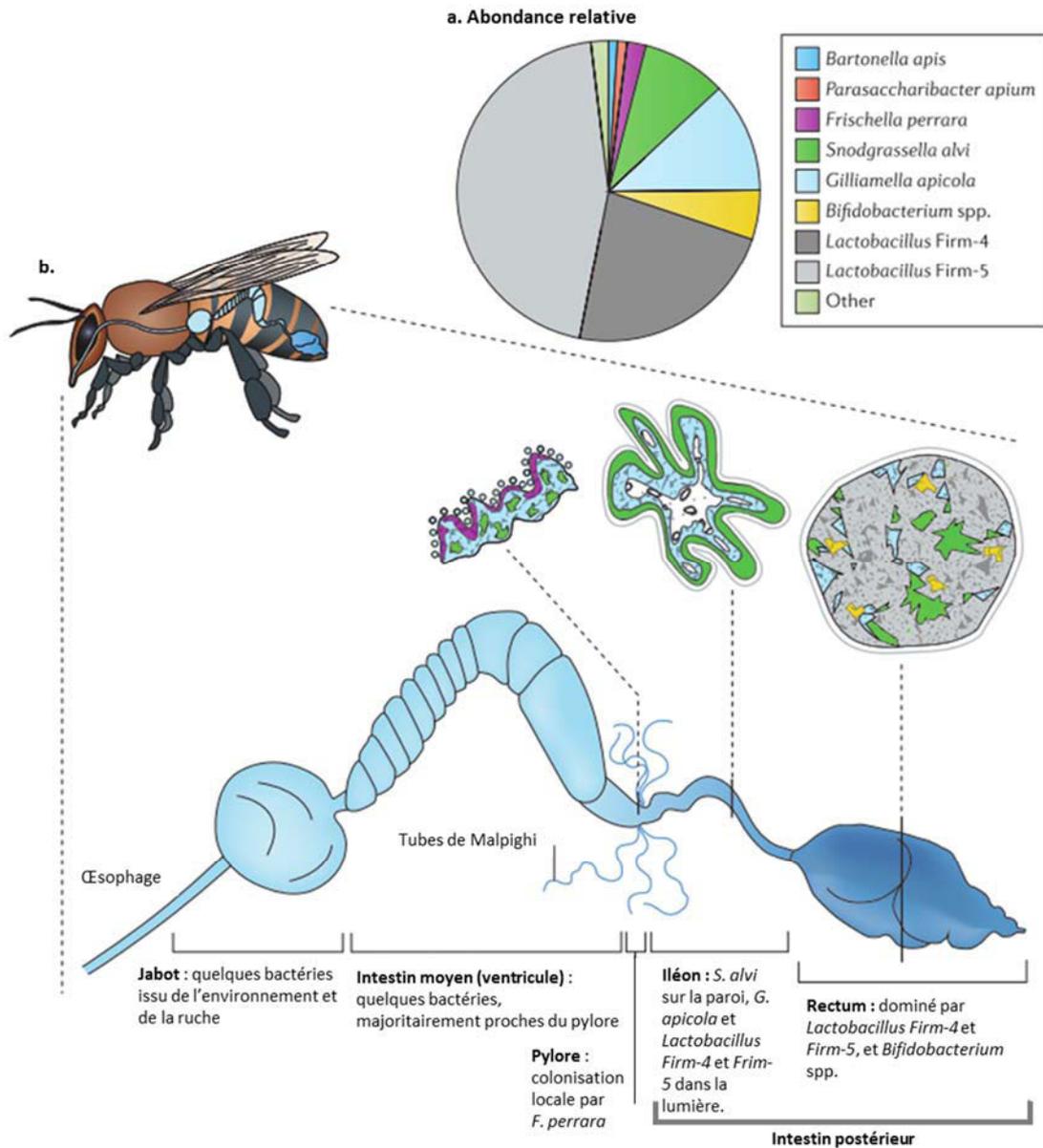


Figure 50. Localisation et composition des communautés bactériennes du tractus digestif de l'abeille. (a) Composition type du microbiote d'une ouvrière adulte. (b) Localisation des espèces bactériennes dans les différents compartiments de l'intestin (jabot, ventricule, pylore, iléon et rectum), déduite à partir de données de PCR quantitative (qPCR) et d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (d'après Kwong and Moran 2016). Les Alphaprotéobactéries *Alpha1*, *2.1* et *2.2* sont retrouvées de façon variable dans l'intestin. *F. perrara*, *S. alvi* et *G. apicola* participent à la formation d'un biofilm dense dans l'iléon. *G. apicola* : *Gilliamella apicola*; *S. alvi* : *Snodgrassella alvi*; *F. perrara* : *Fischella perrara*.

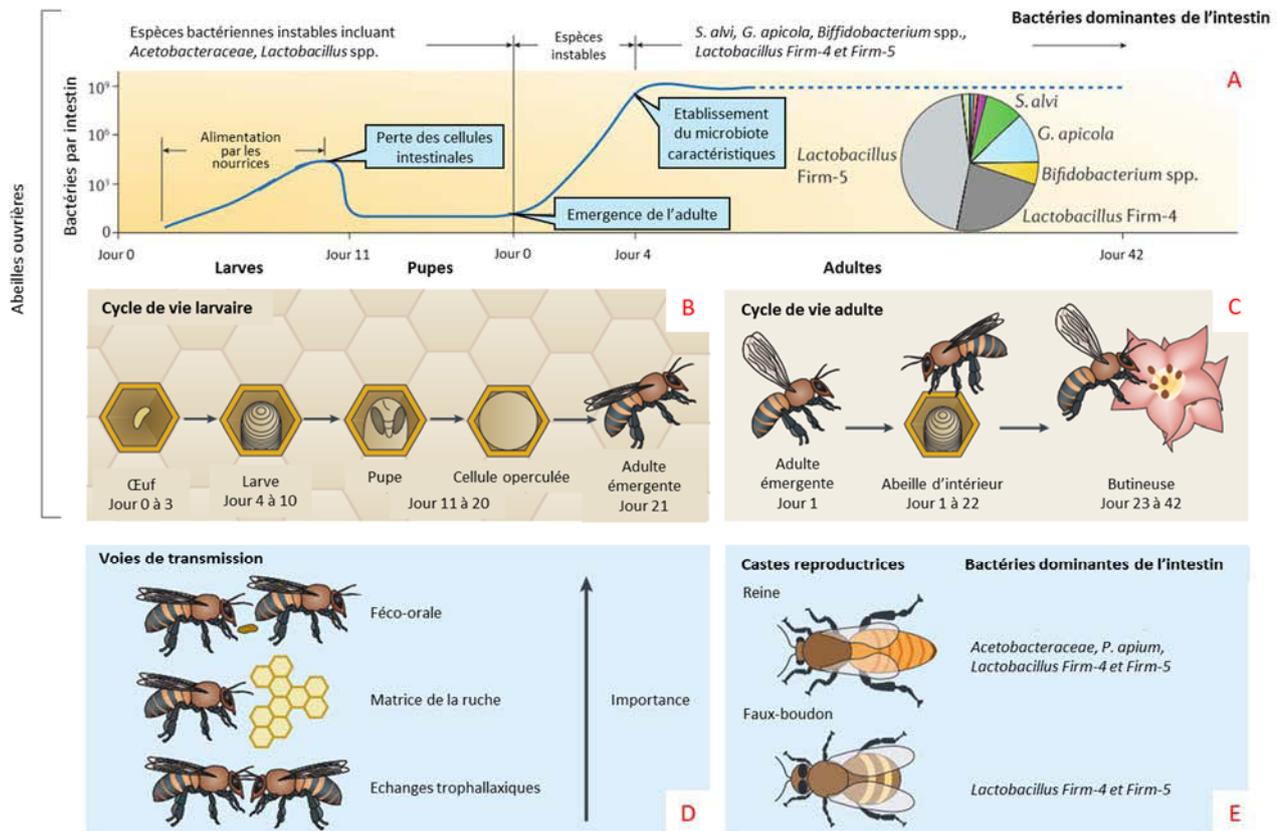


Figure 51. Evolution du microbiote intestinal des abeilles au cours du développement. L'évolution et la constitution du microbiote de la caste ouvrière (A) sont à l'heure actuelle mieux compris et les études commencent à porter sur celui des castes reproductrices (reines et faux-bourçons), suggérant une composition différentes de celles des butineuses (E). Au cours du développement larvaire (B), les abeilles possèdent très peu de bactéries et acquièrent le microbiote intestinal principalement en contact avec des matières fécales, bien que d'autres voies de transmission (échanges trophallaxiques, contacts avec les matrices de la ruche (cires pollen, miel)) puissent également jouer un rôle (D). Le nombre total de bactéries à un stade de vie donné, estimé à l'aide de qPCR avec des amorces bactériennes universelles, varie selon les études. De même, l'abondance des espèces dominantes peut différer entre les individus ainsi que selon les protocoles utilisés (d'après Kwong and Moran 2016). Firm : Firmicutes ; *G. apicola* : *Gilliamella apicola* ; *P. apium* : *Parasaccharibacter apium* ; *S. alvi* : *Snodgrassella alvi*.

2. Microbiote, *Nosema* et pesticides

Peu d'études ont porté sur l'impact de *N. ceranae* sur le microbiote intestinal de l'abeille. Ptaszyńska et collaborateurs (2016) ont montré que la quantité de levures endémiques de l'intestin augmentait de façon constante au cours du temps, jusqu'à 8 à 10 fois, chez les abeilles infectées par rapport aux abeilles non infectées, dont la quantité de levures restait constante (Ptaszyńska *et al.*, 2016b). Cependant, la structure du microbiote intestinal au cours d'une infection par *N. ceranae* n'a jamais été réellement étudiée, bien que l'association du parasite à une dysbiose intestinale en faveur de son propre développement ait déjà été évoquée (Maes *et al.*, 2016).

Une étude portée sur l'utilisation de *Parasaccharibacter apium* (Alphaprotéobactérie *Alpha 2.2*) pour lutter contre *N. ceranae* a montré que l'administration de cette bactérie en probiotique sur des colonies infectées diminuait d'environ 1,7 fois la quantité de microsporidies chez les abeilles traitées (Corby-Harris *et al.*, 2016). Ceci pourrait être directement lié à la particularité de *P. apium* de sécréter des composés antifongiques, tels que l'acide acétique, pouvant nuire au développement de *Nosema*. Or, *P. apium* est une bactérie naturellement présente dans les colonies puisqu'elle a été identifiée dans les réserves de nourriture de la colonie, le microbiote intestinal des larves et celui des reines (Figure 51). Elle pourrait donc jouer un rôle dans la protection de ces dernières faces à *N. ceranae*. Cependant, les chercheurs n'ont pas constaté d'amélioration de la santé globale de la colonie puisqu'ils n'ont pas observé d'augmentation de la quantité de couvain, de butineuses et de réserves en miel et en pollen de la colonie (Corby-Harris *et al.*, 2016).

D'autres études ont porté sur l'impact des pesticides sur le microbiote. Ainsi, les acaricides à base de coumaphos et de *tau*-fluvalinate, utilisés pour lutter contre *Varroa*, et le fongicide chlorothalonil entraînent des modifications de la composition de la flore bactérienne du microbiote intestinal des abeilles, mais ne semblent pas avoir d'effet sur la composition des communautés fongiques (Figure 52) (Kakumanu *et al.*, 2016).

3. Les autres pesticides étudiés lors de ma thèse

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à étudier les effets d'une infection par *N. ceranae* et/ou d'une exposition chronique au fipronil sur les communautés microbiennes de l'intestin, dans le cadre de l'ANR BEELOSS (Figure 2). J'ai aussi administré aux abeilles de la N-acétylcystéine, utilisée dans ma précédente étude (Paris *et al.*, 2017), afin de voir si l'utilisation d'un antioxydant pouvait améliorer l'état global du microbiote intestinal de l'abeille ou protéger celui-ci contre les potentiels effets indésirables de *N. ceranae*. Une étude menée sur des porcelets a montré qu'en présence de N-

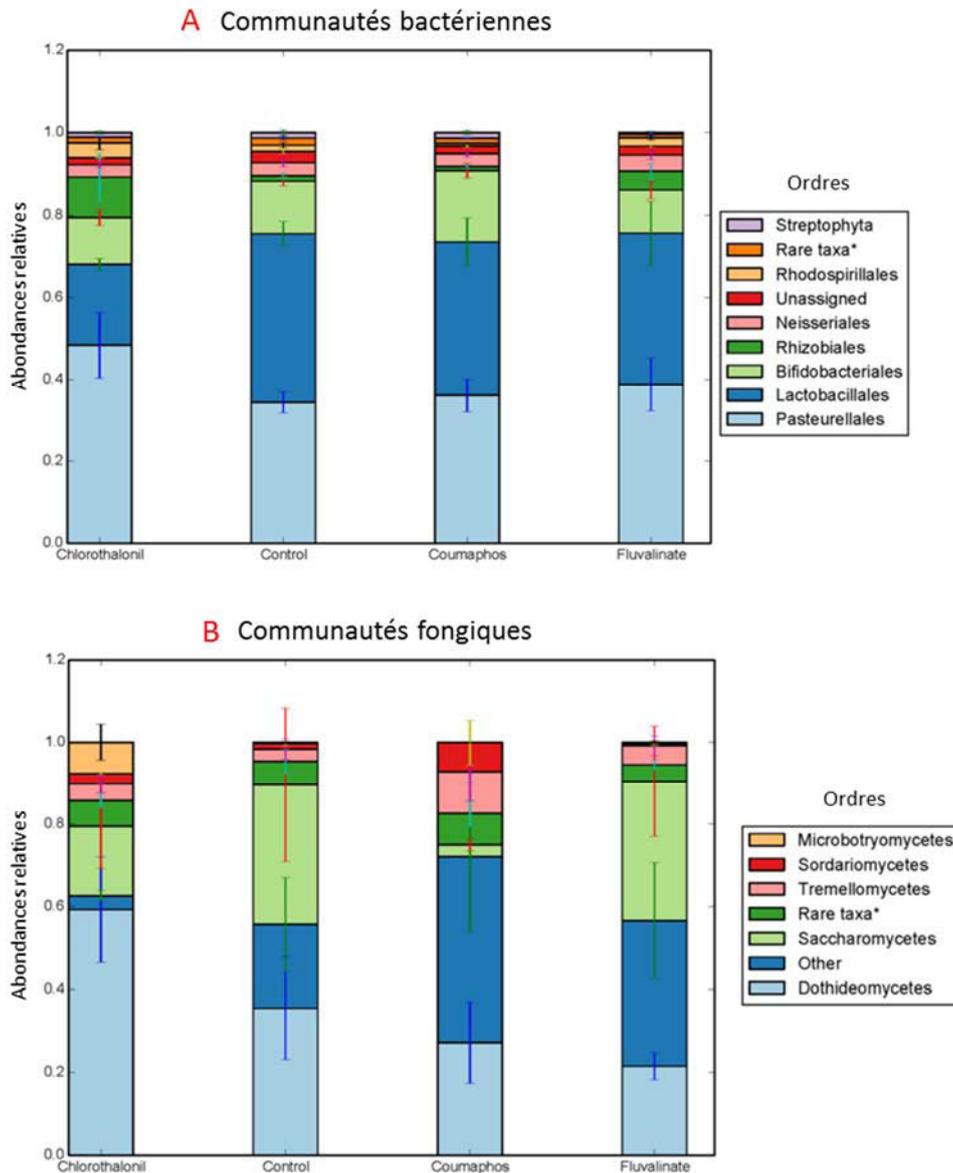


Figure 52. Abondances relatives de l'ADN des communautés bactériennes et fongiques de l'intestin de l'abeille. L'étude a été menée sur des abeilles provenant de colonies exposées (i) au chlorothalonil (fongicide), (ii) à aucun traitement, (iii) au coumaphos (acaricide) et (iv) au *tau*-fluvalinate (acaricide). Les résultats ont montré un effet significatif des traitements sur la structure des communautés bactériennes (A), mais aucun effet significatif n'a été observé sur les communautés fongiques (B) de l'intestin des abeilles (d'après Kakumaru *et al.*, 2016).

acétylcystéine, le développement des communautés de *Bifidobacterium* était stimulé, participant à l'amélioration de la santé des individus (Xu *et al.*, 2014).

Pour cette étude, j'ai travaillé en collaboration avec le Dr. Hicham El Alaoui qui a parallèlement initié un projet financé par la fondation Rovaltain intitulé « **EvaLuation de l'Impact de différents facteurs de Stress (polluants et pathogènes) sur le microbiote intestinal de l'Abeille domestique *Apis mellifera*** » (projet ELISA). Nous nous sommes intéressés, en plus de l'effet du fipronil, à celui de l'insecticide thiaméthoxame, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes, et du fongicide boscalide, un fongicide de la famille des carboxamides. Comme dans le cas du fipronil, j'ai étudié les effets de chacune de ces molécules sur le microbiote intestinal d'abeilles infectées ou non par *N. ceranae*.

3.1. Cas du thiaméthoxame, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes

3.1.1. Description

Les néonicotinoïdes sont des insecticides systémiques, utilisés en enrobage de semences ou trempage des racines, et mis sur le marché dans les années 1990. À l'heure actuelle, sept molécules sont principalement commercialisées et se répartissent en deux groupes : (i) le groupe « nitro » incluant l'imidaclopride, le nitenpyrame, le dinotéfurane, le thiaméthoxame, et la clothianidine (qui est aussi le métabolite principal du thiaméthoxame retrouvé dans les plantes et les insectes) ; (ii) le groupe « cyano » incluant le thiaclopride et l'acétamipride ; le premier groupe étant généralement plus toxique que le second (Pisa *et al.*, 2015).

Le thiaméthoxame ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$), fabriqué par le groupe agrochimique suisse Syngenta, est commercialisé sous le nom de Cruiser[®], Actara[®] ou encore Luzindo[™]. Tout comme le thiaméthoxame, la clothianidine, commercialisée par Bayer sous le nom de Poncho[®], présente également une forte toxicité pour les insectes. En 2013, ces deux molécules ainsi que l'imidaclopride se sont vues partiellement suspendues, la Commission européenne interdisant la vente de semences traitées suite aux analyses de études scientifiques menées sur les abeilles en 2012 par l'EFSA (Commission européenne, 2013). De même, les traitements de semences et du sol sont interdits, hormis pour les cultures sous serres et les céréales d'hiver, tandis que les produits servant aux traitements foliaires ne sont pas interdits sous serres et après la floraison. Cette réglementation quelque peu laxiste sur l'utilisation de ces molécules n'empêche pas la dispersion de ces molécules dans le milieu naturel et par conséquent, la contamination des écosystèmes en raison de leur rémanence.

Neurotoxique pour les insectes, le thiaméthoxame est largement utilisé en agriculture intensive pour lutter contre les insectes suceurs, en bloquant le SNC. Les néonicotinoïdes sont en effet des agonistes non-compétitifs du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nACh-R) (Casida & Durkin,

2012). En conditions normales, l'acétylcholine fixée au récepteur est dégradée en quelques secondes par les acétylcholinestérases pour stopper l'influx nerveux, tandis que les néonicotinoïdes vont persister quelques minutes, engendrant une ouverture prolongée du canal ionique, laissant pénétrer une forte quantité d'ions sodium Na^+ . Cette entrée d'ions permet de dépolariser la membrane du neurone et assure la propagation du message nerveux. Dans ce contexte d'intoxication, les neurones se retrouvent hyperstimulés ce qui entraîne la mort de l'organisme

3.1.2. Thiaméthoxame, abeille et *Nosema*

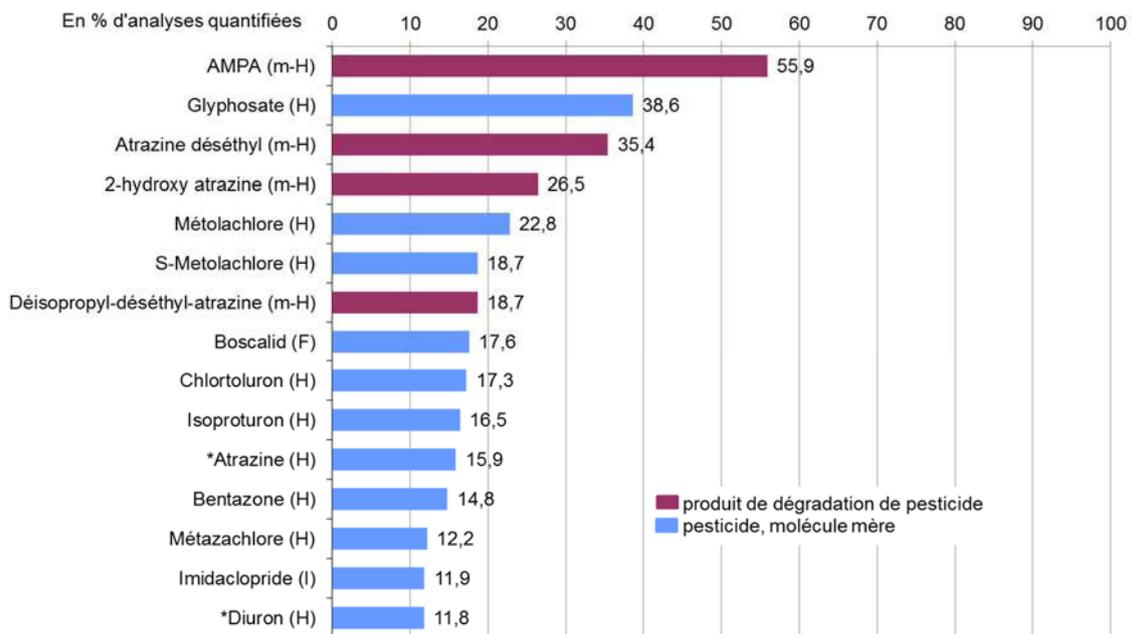
La toxicité du thiaméthoxame par voie orale sur les abeilles est du même ordre que celle du fipronil puisque sa DL_{50} en 48h est de 5 ng par abeille. Cependant, sa toxicité par contact est 4 fois plus importante que celle du fipronil, puisque la DL_{50} est de 24 μg /abeille contre 5,9 (Tableau 4).

Henry et ses collaborateurs ont montré, dans des études menées sur colonies en plein champ, que l'exposition à de faibles doses de thiaméthoxame diminuait la survie des abeilles butineuses. De plus, les butineuses des colonies se trouvant à proximité des champs traités au thiaméthoxame disparaissaient plus rapidement que celles non-exposées, probablement dû à une désorientation des abeilles, même si les colonies parvenaient à compenser ces pertes (Henry *et al.*, 2012, 2015).

De la même façon que pour le fipronil, les conséquences du thiaméthoxame sur les individus sont d'ordre cérébral et musculaire. Il a en effet été montré que le thiaméthoxame entraînait une paralysie des muscles alaires des abeilles exposées à des gouttes de guttation contaminées même si cela n'a pas toujours été confirmé lorsque les abeilles sont exposées à des doses sublétales (Pisa *et al.*, 2015). De plus, une dose de 1 ng par abeille en utilisation topique (correspondant à environ 1/30^{ème} de la DL_{50} par contact à 24h) engendre une diminution significative des performances d'apprentissage des abeilles, bien que la mémorisation ne soit apparemment pas modifiée (Aliouane *et al.*, 2009).

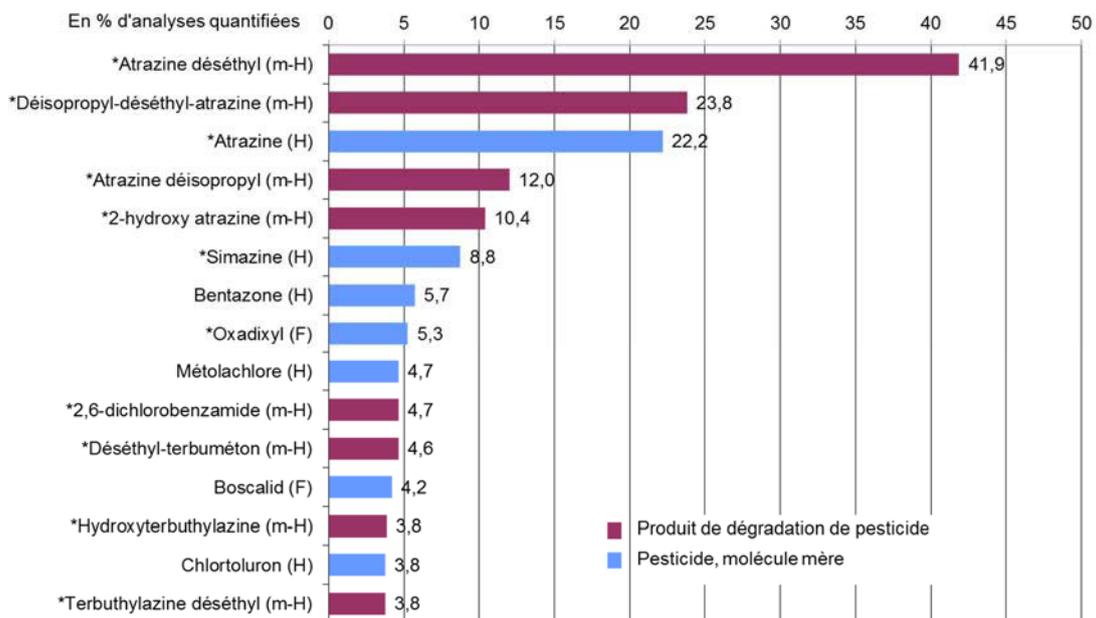
Enfin, le thiaméthoxame semble avoir des effets délétères sur la survie et le développement des larves et des pupes, entraînant une diminution des abeilles émergentes. À terme, cela pourrait entraîner une déperdition d'abeilles dans les colonies qui s'en verraient affaiblies (Tavares *et al.*, 2017).

L'effet combiné du thiaméthoxame et du parasite *N. ceranae* sur les abeilles a notamment été étudié par Gregorc et collaborateurs, en particulier au niveau de l'épithélium intestinal. Ils ont ainsi observé une dégénérescence accrue de celui-ci suite à la co-exposition, pouvant entraîner une diminution de l'absorption des nutriments par l'intestin (Gregorc *et al.*, 2016).



Notes : * molécule interdite ; H et m-H : herbicide ou son produit de dégradation ; F : fongicide ; I : insecticide. Le métolachlore et le S-métolachlore, son produit de remplacement autorisé, ont été distingués à ce stade de connaissance même si en pratique, les laboratoires ne les différencient pas systématiquement.
Source : agences de l'eau. Traitements : SOeS, 2015

Figure 53. Pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de France métropolitaine en 2013. 13 des 15 molécules retrouvées étaient des herbicides ou des produits issus de leur dégradation. 1 580 points de mesures ont été réalisés concernant le fongicide boscalide qui était la 8^{ème} molécule la plus présente en 2013 (SOeS).



Notes : * molécules interdites ; m-H : herbicide ou son produit de dégradation ; F : fongicide. Le métolachlore n'est pas noté en tant qu'interdit car de nombreux laboratoires ne le distinguent pas du S-métolachlore, son produit de remplacement autorisé.
Sources : agences de l'eau ; BRGM, banque de données ADES, 2014 ; réseaux RCS-RCO. Traitements : SOeS, 2015

Figure 54. Pesticides les plus quantifiés dans les eaux souterraines de France métropolitaine en 2013. Sur les 607 substances pesticides recherchées en 2013 dans les eaux souterraines de France métropolitaine, 220, soit 36 %, ont été retrouvées au moins une fois dans les nappes. Parmi les 15 pesticides les plus quantifiés, 13 sont des herbicides ou des produits issus de la dégradation d'herbicides et 2 sont des fongicides. Le fongicide boscalide est donc le 12^{ème} pesticide le plus présent dans les nappes phréatiques sous sa forme non dégradée. Les données de cette molécule ont été calculées à partir de 1 304 points de mesure. Dans les départements d'outre-mer, le boscalide est absent de cette liste (SOeS, 2015).

3.2. Cas d'un fongicide : le boscalide

3.2.1. Description

Le boscalide ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$) est un fongicide de la famille des carboxamides. Il est utilisé dans le traitement des champignons pathogènes en inhibant la succinate déshydrogénase de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe II). Par conséquent, il inhibe la production d'ATP dans les cellules des organismes cibles, mais aussi la production d'acides aminés, de lipides et d'acides gras produits *via* le cycle de Krebs (Avenot & Michailides, 2007). Vendu par BASF pour lutter contre le botrytis de la vigne (Cantus[®]) ou sur les légumes et céréales (Pictor[®] Pro), pour traiter différents céréales (Rubis[®] ou encore Bell[®] Star), il est recommandé pour une utilisation préventive sur différents types de cultures, en inhibant la germination des spores et en bloquant la formation de l'appressorium des champignons types Ascomycètes et Deutéromycètes. Dans certains cas, le boscalide peut également réduire la croissance mycélienne et limiter la différenciation des spores. Comme les insecticides, le boscalide peut persister dans l'environnement et contaminer différentes matrices dont l'eau. En France métropolitaine, il fait partie des pesticides les plus fréquemment retrouvés, et le fongicide le plus présent dans les eaux de surface et les eaux souterraines en 2013¹⁵ (Figures 53 et 54). Utilisé en pulvérisation, il est parfois recommandé de l'appliquer en pleine période de floraison afin de limiter la propagation des champignons sur les fleurs des arbres fruitiers ou des vignes par exemple (indications fournies par le fournisseur BASF), exposant davantage les pollinisateurs à de fortes doses.

113

3.2.2. Boscalide et abeilles

Les données de l'AGRITOX indiquent que les valeurs des DL_{50} à 48 heures sont de 200 μ g par abeille pour le contact et 166 μ g par abeille, soit 0,2 fois moins toxique que le DDT pour les abeilles (Tableau 4). Le boscalide et ses métabolites ont été détectés dans les différentes matrices de la ruche où les abeilles ont été artificiellement exposées au fongicide (Jabot *et al.*, 2016).

Il a été montré que les colonies exposées au boscalide sous sa formulation commerciale Pristine[®] (qui contient également du pyraclostroline, une autre molécule fongicide) *via* du pollen contaminé, voyaient leur consommation en pollen diminuer, probablement liée à une atteinte de leur capacité de digestion des protéines ainsi qu'une baisse d'énergie générale traduite par une diminution de la concentration en ATP (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2017).

Le complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale étant sa cible préférentielle, le boscalide ne devrait pas avoir d'action sur *Nosema* car ce champignon est caractérisé par l'absence de mitochondrie.

¹⁵ <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/0/pesticides-plus-rencontres-eaux-souterraines.html> Consulté le 13/03/2017 à 10h50.

Le travail mené lors de ma thèse sur l'étude de la composition du microbiote des abeilles infectées par *N. ceranae* et/ou exposées aux pesticides ou à la N-acétylcystéine, est présenté ci-après sous forme d'article scientifique qui devrait être soumis prochainement. Ce travail avait pour but d'analyser l'impact des stressseurs sur les communautés bactériennes et fongiques. Cependant, seules les données de séquençage des communautés bactériennes ont pu être analysées à ce jour, et les analyses des communautés fongiques sont en cours de traitement. La prépublication présente donc les principaux résultats obtenus au cours de notre travail.

Gut dysbiosis induced by co-exposition to pesticides and *Nosema ceranae* in the western honeybee *Apis mellifera*

Laurianne Paris, Anne Moné, Élodie Peghaire, Marie Diogon, Didier Debroas, Frédéric Delbac, Hicham El Alaoui*.

Université Clermont Auvergne, CNRS, LMGE F-6300 Clermont-Ferrand.

* Corresponding author

E-mail: hicham.el_alaoui@uca.fr; Tel. (+33) 4 73 40 74 31. Fax. (+33) 4 73 40 76 70. Address: Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement - 1 Impasse Amélie Murat - TSA 60026 - CS 60026 - 63178 Aubière Cedex - France.

Abstract

Honeybees ensure a key ecosystemic service by pollinating many crops. Since few decades, colonies are declining worldwide and the origin is now considered to be multifactorial, with a strong emphasis on both parasites and pesticides. Indeed, foraging activity exposes bees to multiple biotic (pathogens) and abiotic (pollutants, pesticides) stressors. Infestations of *Nosema ceranae* and the use of pesticides can contribute to gut dysbiosis phenomena, resulting in a perturbation of the honeybee physiology. Here, we determined the effects of *N. ceranae* and pesticides (the neonicotinoid insecticide thiamethoxam, the phenylpyrazole insecticide fipronil and the carboxamidic fungicide boscalid) alone and in combination on the honeybee gut microbiota. As these stressors have a pro-oxidant effect, we also aim to analyse the effect of an anti-oxidant agent, the N-acetylcysteine. We fed newly emerged bees with stressors, and then monitored honeybee survival, *N. ceranae* growth and bacterial community composition from gut. Fipronil and thiamethoxam decreased significantly honeybee survival whereas boscalid did not impact it. We observed an increased mortality when bees were co-exposed to fipronil or boscalid and *N. ceranae*, with a synergistic negative effect of the latter pesticide on survival. Regarding gut microbiome composition, the

infection and the co-exposition to the parasite and pesticides or N-acetylcysteine have decreased the *Alphaproteobacteria* (*Rhizobiales* order) activity, and the co-exposition increased the *Gammaproteobacteria* activity. Bacteria belonging to *Clostridia* (*Clostridiales* order) were more active in the infected group, arguing for a possible association with *N. ceranae* infection. In the same vein, a particular genus, the *Spiroplasma* (*Entomoplasmatales* order, *Mollicutes* class) was detected exclusively in the infected group treated with boscalid, suggesting that both stressors could be involved in the observed mortality. Our findings demonstrate that typically occurring expositions to *N. ceranae* and pesticides play a significant role in colony health and the establishment of a dysbiotic gut microbiota.

Introduction

The intestinal microbiota is constituted by different species of bacteria, archaea and eukaryotes. In social insects, particularly in honeybees, it is often studied in order to understand host/microbiome interactions and their consequences on insect physiology. This is of particular interest as it shares common characteristics/functions with the mammal microbiota. Honeybees acquire their microbiota through interactions with environment and social

exchanges (Powell *et al.*, 2014). However, contrary to mammals (including humans), the honeybee microbiota is relatively few complex, principally composed only by eight species which are considered as the “bacterial core”, which is common in all honeybees and represents 95 to 98% of intestinal bacteria (Moran *et al.*, 2012; Sabree *et al.*, 2012). The gut microflora is known to be an important component of the honeybee health (Alberoni *et al.*, 2016). Indeed, it is known to be the support of the nutrition (vitamin, fatty acid and amino acid synthesis or lignin and carbohydrate degradation...) (Engel and Moran, 2013a; Kwong *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015), of the immune system stimulation and maturation (increasing the antimicrobial peptide gene expression, intestinal cell maturation) and biofilm formation in the gut which forms a protective barrier against pathogens (Martinson *et al.*, 2012; Vásquez *et al.*, 2012). The gut microflora also participates to the pheromone production and the pesticide and pollutant degradation.

Consequently, many studies have recently focused on the study of the intestinal microbiota of the honeybee *Apis mellifera*, at both colony and individual scales (Cox-foster *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2012; Corby-Harris *et al.*, 2014; Leonhardt and Kaltenpoth, 2014; Kwong and Moran, 2015, 2016; Moran, 2015). The honeybee gut is the site of various disturbances such as the presence of pathogens, including the microsporidia *Nosema ceranae*, or the absorption of ingested pesticides. The presence of these factors could affect the intestinal microflora and, therefore, could exacerbate the disruptive effect of these troublemakers.

The microsporidium *Nosema ceranae* is among the most common pathogen in *Apis mellifera*, with a worldwide distribution (Goulson *et al.*, 2015). This is an obligate intracellular parasite which invades and develops within the cytoplasm of the epithelial cells of the adult honeybee gut and has been, in some cases, associated with the weakening of colonies (Higes *et al.*, 2006; Fries, 2010). Honeybees become

mainly infected when they ingest *Nosema* spores, exchanged by trophallaxis or from environmental sources (pollen, nectar, water, guttation) (Higes *et al.*, 2010; Smith, 2012). The major disturbances described in infected honeybees are energetic stress (Mayack and Naug, 2009; Alaux *et al.*, 2010a), behavioral fever (Campbell *et al.*, 2010; Dussaubat *et al.*, 2013), hormonal disturbance (Dussaubat *et al.*, 2010; Holt *et al.*, 2013), immunity depletion (Antunez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010a) and a decrease in the insect lifespan (Higes *et al.*, 2008; Alaux *et al.*, 2010a; Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014; Goblirsch *et al.*, 2013). Different studies have also shown that the combination of *N. ceranae* with sublethal doses of insecticides like fipronil or neonicotinoids led to a significant decrease in the survival of workers (Vidau *et al.*, 2011; Aufauvre *et al.*, 2012, 2014) or that of queens (Dussaubat *et al.*, 2016).

Fipronil is a phenylpyrazole insecticide that acts as an inhibitor of the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor (Casida and Durkin, 2012), with a strong affinity for the invertebrate receptors (Hainzl *et al.*, 1998) and the glutamate-activated chloride channels which are present only on invertebrate neurons (Narahashi *et al.*, 2009). It is widely used for the control of arthropods and especially lepidopteran pests, in the form of dispersible granules, concentrated aqueous solutions or seed coating, on worldwide crops which could be pollinated especially by honeybees. Thiamethoxam is a neurotoxic systemic pesticide widely used in intensive agriculture. Like other neonicotinoids, it is an agonist of acetylcholine (nACh) receptor (Casida and Durkin, 2012) which, as it is the case for fipronil, damages the central nervous system of insects. Finally, boscalid is a fungicide of the carboxamid family which inhibits the succinate dehydrogenase of the mitochondrial chain. It is used in agriculture in order to efficiently control phytopathogenic fungi (Avenot and Michailides, 2007).

Both *Nosema ceranae* and pesticides may alter the behaviour, the physiology and the survival of honeybees at different levels, in combination or not (Bernadou *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010b; Dussaubat *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013). But underlying mechanisms leading to physiological perturbations or honeybee death are unknown. So, the question remains whether dysbiosis of the intestinal microbiota could be a direct cause for such disorders. We have chosen to study the impact on honeybee gut microbiota of three classes of pesticides: a phenylpyrazole (fipronil), a neonicotinoid (thiamethoxam) and a fungicide (boscalid) alone or in combination with *N. ceranae* infection. As these stressors are considered as pro-oxidants (Ki *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013), we analysed also an antioxidant molecule (N-acetylcysteine) in order to know the contribution of this molecule on honeybee health (restoration of the intestinal flora and protection against nosemosis) and microbiota development. We worked on emerged honeybees infected with *N. ceranae* and chronically exposed to these molecules. At different times, we scored honeybee survival and parasite growth and analysed the gut microbiota composition with a 16S sequence analysis in order to identify correlations between stressor exposition physiological disturbances and gut microbiota composition.

Materials and Methods

Honeybee artificial rearing and infection procedure

Experiments were performed with emerged honeybees from *Apis mellifera* colonies, which come from the same apiary (Clermont Auvergne University, Clermont-Ferrand, France). Three frames of sealed brood were collected in three different colonies and placed in incubators in the dark at 33°C with approximately 60% relative humidity. Emerging honeybees were collected directly on the frames, confined to Pain-type cages into groups of 50, and maintained in incubators for two days until their infection with

Nosema ceranae. During this time, the bees were fed with 50% sucrose syrup (w/v) complemented with 1% (w/v) nutritional supplement (Provita' Bee, ATZ Dietetic) and pollen was given *ad libitum* during two days (**Figure 1**). To mimic the hive environment, a small piece of PseudoQueen® (Contech Enterprises Inc.) releasing queen's mandibular pheromones was positioned in each cage. After two days of feeding, ten experimental groups were established: (i) uninfected and untreated group (Control), (ii) infected with *N. ceranae* (Infected), (iii) uninfected-NAC control fed with syrup supplemented with 1 mM N-Acetyl-Cysteine (NAC), (iv) infected with *N. ceranae* and fed with 1 mM NAC (INAC), (v) uninfected-fipronil control fed with syrup supplemented with 0.5 µg/L fipronil (FIP), (vi) infected with *N. ceranae* and exposed to 0.5 µg/L fipronil (IFIP), (vii) uninfected-thiamethoxam control fed with syrup supplemented with 1.5 µg/L thiamethoxam (THIAM), (viii) infected with *N. ceranae* and exposed to 1.5 µg/L thiamethoxam (ITHIAM), (ix) uninfected-boscalid control fed with syrup supplemented with 100 µg/L boscalid (BOSC), and (x) infected with *N. ceranae* and exposed to 100 µg/L boscalid (IBOSC). Each experimental group was composed of 3 cages.

Stock solutions of fipronil (70 g/L), thiamethoxam (1.5 mg/L) and boscalid (100 mg/L) were prepared in DMSO, leading to a final respective percentage of 0.0025%, 0.05% and 0.1% DMSO in the feeding syrup. Caged-honeybees from the Control and Infected groups were fed with 0.1% DMSO-containing sucrose syrup. During all the experiment, honeybees were fed *ad libitum* with sucrose syrup prepared as previously described, complemented or not with treatment according to their experimental group. Every day, dead bees were removed and scored, and sucrose consumption was quantified.

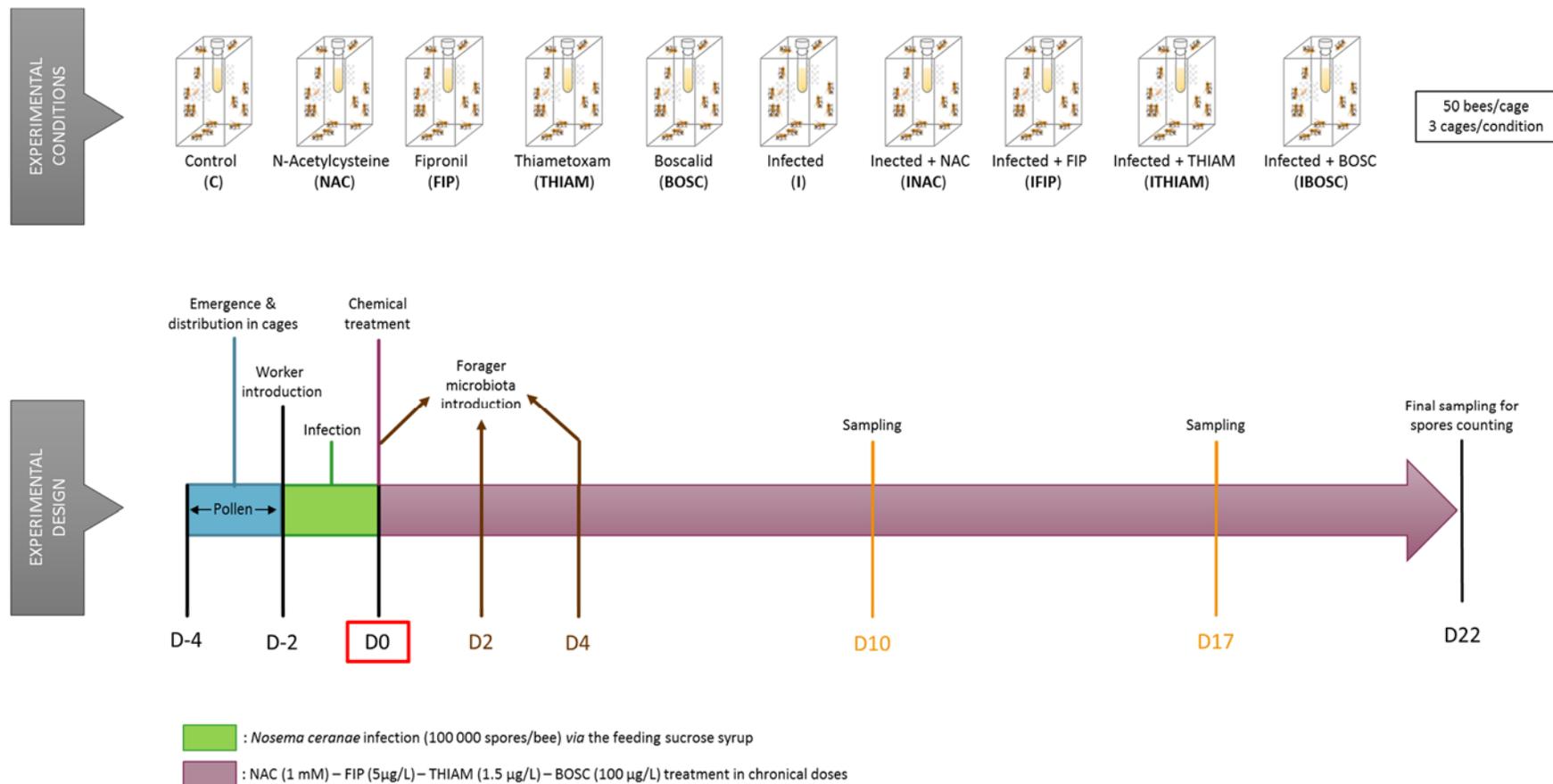


Figure 1. Experimental design. Three frames of sealed brood were collected in three different colonies. Emerging honeybees were collected and placed in cages in groups of 50 bees. Ten groups were composed (described on the top of the figure). Six workers (three nurses and three foragers) from the three colonies were introduced in each cage. Infection of *N. ceranae* was done with 100 000 spores per bee via the feeding syrup during two days. At the end of the inoculation (D0), chemical treatments were administrated *ad libitum* in the syrup, renewed every two days. At day 0, 2 and 4, a homogenate of foragers microbiota was administrated in the syrup during two days. At D0 sampling of the pollen, the spore solution and the intestinal tract of introduced adult and emerging bees were done. At D10 and D17, the intestinal tract of experimental honeybees was sampled. NAC = N-acetylcysteine (antioxidant) ; FIP = fipronil (phenylpyrazole insecticide) ; THIAM = thiametoxam (neonicotinoid insecticide) ; BOSC = boscalid (carboxamid fungicide).

Honeybee infection procedure

N. ceranae spores were obtained according to Roussel *et al.* (2015) one month before the experimentation and stored at room temperature. *Nosema* species was confirmed by PCR as described in Paris *et al.* (2017). Two days after the emergence of bees, the five infected groups (Infected, INAC, IFIP, ITHIAM and IBOSC) received a dose of 100 000 *N. ceranae* spores per bee in the sucrose solution. This dose was administered during two days in the syrup, while uninfected bees were fed with sucrose only. The last day of infection by *N. ceranae* determined the zero time of experimentation. The spore load was evaluated at the end of experimentation, 22 days post-infection. Five honeybees per cage were dissected, corresponding to 20 bees by experimental condition using the protocol described in Paris *et al.* (2017).

Microbiota establishment

We used a procedure based on Powell *et al.* (2014) in order to induce the establishment of a “natural” microbiota in the emerged honeybee digestive tract. We placed in each cage six worker bees from the three colonies from which brood were collected: one nurse and one forager from each colony were sampled, anaesthetized with CO₂, and marked with a paint dot on the thorax. They were then introduced in cages to promote a transfer of microbiota by trophallaxy to the emerged bees. Moreover, at days 0, 2 and 4, we complemented the syrup for two days with the microbiota of adult bees. For this purpose, the gut and the rectum of 22 foragers of each hive (66 in total) were sampled, crushed in 150 µL of PBS and added to the syrup.

Gut dissection and sampling method

The sampling was done at D0 on the pollen, the spore solution and the intestinal tract of six introduced workers and six emerging bees. At days 10 and 17, six honeybees were caught in each cage. The intestinal tract, from the anterior intestine to the rectum, was dissected on a glass plate maintained on ice, placed in a tube

containing 600 µL RLT (Qiagen®) buffer and 6 µL β-mercaptoethanol, and immersed in liquid nitrogen. The sampling of experimental bees was done at day 10 and 17 after infection by *N. ceranae*. Two pools of 3 intestinal tract/cage/condition/day were sampled for the DNA/RNA co-extraction which was carried out extemporaneously.

DNA/RNA co-extraction

The sampling tubes were placed on ice during all steps. 60 mg of 0.1 mm silica beads previously treated with diethylpyrocarbonate were added and samples were homogenized in bead beater (5 pulses for 20s at 300 Hz). Next, tubes were centrifuged 1 min at 600 x g at 4°C. Supernatant was kept in DNase/RNase free tubes. Then the tubes were frozen in liquid nitrogen and heated at 65°C 3 times and centrifuged at 8000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred in DNA column and centrifuged 1 min at 8000 x g. The simultaneous purification of DNA and RNA was applied according to the instructions of manufacturer (AllPrep DNA/RNA Mini kit, Qiagen®). The two pools of RNA for each cage were collected in the same final tube and kept at -80°C, and all RNA extractions obtained with the co-extraction protocol were treated with DNase to remove contaminating DNA (RNase-Free DNase Set, Qiagen®). Purified DNA and RNA were quantified by NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and the RNA concentration was measured with an Agilent instrument (2200 TapeStation, Agilent Technologies) and the RNA ScreenTape kit (Agilent Technologies), according to the instructions given by the manufacturers.

cDNA synthesis and 16S rRNA gene amplification and sequencing of barcoded amplicons

RNA samples were reverse-transcribed with random primers using the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen™). Amplification of the V3/V4 region of the 16S rDNA and rRNA was performed using the universal primer 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGTA-3') and

bacteria/archaea specific primer 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3'). Primers were modified by adding barcodes. PCR were performed using a high-fidelity polymerase (Platinum™ Taq DNA polymerase high-fidelity, Invitrogen™), and the program consisted in a step at 94°C for 3 min, and 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing at 59°C for 30 s, elongation at 68°C for 30 s and a final elongation at 68°C for 7 min. The PCR products were run on agarose gel electrophoresis, the amplicons were purified and concentrated using the Qiagen Gel extraction kits (Qiagen®), and quantified using The Agilent 2200 TapeStation system and the D1000 ScreenTape kit (Agilent Technologies). Tagged amplicon pools were constructed in a concentration of 20 ng/μL for Illumina Sequencing Technology (Run type: Paired end-Read length: 2 x 300 bp) by GATC Biotech.

Bioinformatic and statistical analysis

The MiSEQ data were assembled with the vsearch tool (<https://github.com/torognes/vsearch>) and the sequences were cleaned as follows: sequences were removed if they presented ambiguous bases “N”, a length shorter than 200pb, and had a mismatch in the forward and reverse primers. The putative chimaeras were detected by vsearch (denovo command). The remaining rRNA 16S were clustered into “molecular species” (OTU) at a 97% according to Kim *et al.* (2011) with vsearch (option cluster_small sorted by length). The representative sequence for each OTU was inserted into phylogenetic trees for taxonomic annotation. The seed OTUs were affiliated by similarity and phylogeny from reference sequences. These microbial references were extracted from the SSURef SILVA database (Pruesse *et al.*, 2007) according to the following criteria: length > 1,200 bp, quality score >75% and a pintail value > 50. After comparing the OTUs with the reference sequences using a similarity approach (vsearch tool), trees including OTUs with their closest references were built with

FastTree (Price *et al.*, 2010). The different taxonomic affiliations obtained were checked for inconsistency. This process was implemented using the pipeline PANAM (Phylogenetic Analysis of Next-generation Amplicons <https://github.com/panammeb/>) and is described in more detail in Taib *et al.* 2013 and using the LCA (Lowest Common Ancestor) assignment that demonstrated to be more accurate.

Statistical analysis was performed using R 3.2.5 software (<https://cran.r-project.org/>). The error rate was set at $\alpha=0.05$. Results of spore load were presented as the mean \pm confidence interval (CI), according to statistical distribution, and kruskal-Wallis test was applied. For the analysis of sequences data, Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s test to which the Benjamini-Hochberg correction was applied so as to compare the different conditions for each class and order.

Results

Honeybee survival, sucrose consumption and spore load

The exposition to fipronil significantly decreased the survival of uninfected (FIP) and infected (IFIP) bees, with 65.2 and 74.4% mortality rate, respectively. These conditions were significantly different from the control group (*i.e.* uninfected bees) but not between them ($p<0.001$). Moreover, fipronil induced more bees mortality in infected bees (IFIP) than *N. ceranae* only (Infected) ($p=0.026$) while no difference between Infected and honeybees treated with fipronil (FIP) was observed ($p=0.458$). In the same way, thiamethoxam had a significant impact on the uninfected bee survival (THIAM), with 53.6% of mortality, and infected bees survival (ITHIAM) where the mortality rate was 63.8% compared to the 37.5% of mortality in the control group ($p=0.005$ and $p<0.001$, respectively). But no difference was observed between the two thiamethoxam-treated groups ($p=0.450$). The treatment with boscalid did not

alter the survival of uninfected bees (BOSC, $p=0.099$), while that of infected and intoxicated bees was greatly affected (IBOSC) since it reached

about 84.4% at D22 ($p<0.001$) with a synergy observed between D8 to D17 (except at D10) (**Figure 2 and see Table S1 for details**).

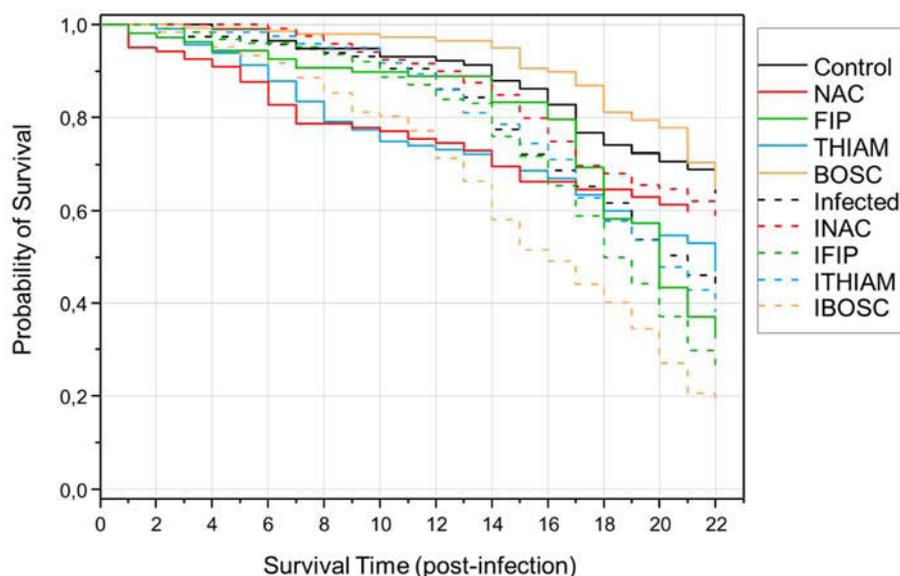


Figure 2. Survival analysis of honeybees after infection with *Nosema ceranae* and/or exposure to the pesticide or to the antioxidant. The data show the cumulative proportion of surviving honeybees not exposed to *N. ceranae* or molecule (Control), exposed to *N. ceranae* (Infected), to antioxidant N-acetylcysteine 1 mM (NAC), to fipronil 0.5 $\mu\text{g/L}$ (FIP), to thiamethoxam 1.5 $\mu\text{g/L}$ (THIAM), to boscalid 100 $\mu\text{g/L}$ (BOSC), to *N. ceranae* + NAC (INAC), or + fipronil (IFIP), or + thiamethoxam (ITHIAM) or + boscalid (IBOSC) combinations. The data from three replicates of 50 honeybees in each condition were analysed using the Kaplan-Meier model and the Cox-Mantel test (see Table S1). D0 corresponded to the first day of chemical treatment which was done after the two days of infection.

The treatment with the antioxidant did not induced mortality in uninfected bees (NAC) compared to the control group (40.6 and 37.5%, respectively). But, in infected bees, the survival was significantly improved in infected bees (INAC, 42.7%) compared to the infected group (57.3%, $p=0.022$). No significant difference between the different conditions was observed concerning the cumulative sucrose consumption. Consequently, each group had ingested the same amount of pesticides at the end of experiment: NAC and INAC consumed $0.14 \pm 0.01 \mu\text{g/bee/24h}$ of antioxidant, FIP and IFIP: $0.379 \pm 0.005 \mu\text{g}$ of fipronil, THIAM and ITHIAM: $1.14 \pm 0.03 \text{ ng}$ of thiamethoxam and BOSC and IBOSC: $69.3 \pm 5.6 \text{ ng}$ of boscalid. The spore load was similar when infected bees were treated with pesticides (IFIP, ITHIAM and IBOSC) or with the antioxidant (INAC) (**Figure 3**).

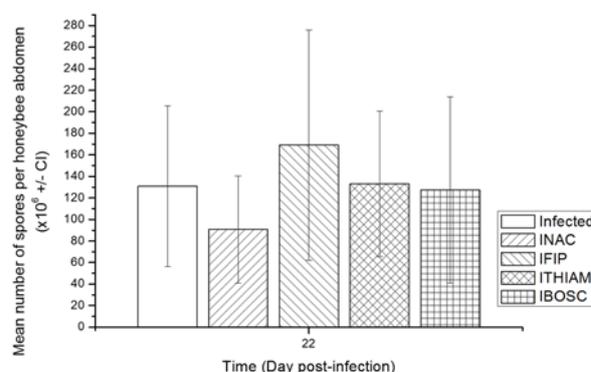


Figure 3. Spore loads of infected bees in different experimental groups. The spore production in the whole abdomen was evaluated at the end of experiment (D22) for the five infected groups (*N. ceranae* alone (Infected); supplemented with N-acetylcysteine 1 mM (INAC), or 0.5 $\mu\text{g/L}$ of fipronil (IFIP), or 1.5 $\mu\text{g/L}$ of thiamethoxam (ITHIAM) or 100 $\mu\text{g/L}$ of boscalid (IBOSC)). The data represent the mean number of spores per honeybee abdomen ($\times 10^6$; error bars represents 95% confidence interval) from 21 (7 \times 3 cages) honeybees per condition. After verification of the data normality, Kruskal-Wallis test revealed that no difference was obtained between the five groups ($p=0.083$).

Analysis of bacterial communities by massive sequencing

The microbiote DNA of emerging honeybees was mostly constituted of *Gammaproteobacteria* (98.6%) which are mostly composed of the genus *Gilliamella* (93% of identified genus (*Orbales* order) found in older worker bees. In comparison, the forager microbiota was composed of

Gammaproteobacteria (53.7%), *Alphaproteobacteria* (17.0%), *Betaproteobacteria* (15.8%), *Bacilli* (10.1%), *Mollicutes* (2.0%) and unclassified *Proteobacteria* (1.4%). Pollen used to feed emerging bees contained DNA *Gammaproteobacteria* (74.7%), *Bacilli* (11.6%), *Clostridia* (10.4%), and 3% of unclassified *Proteobacteria* (Figure 4).

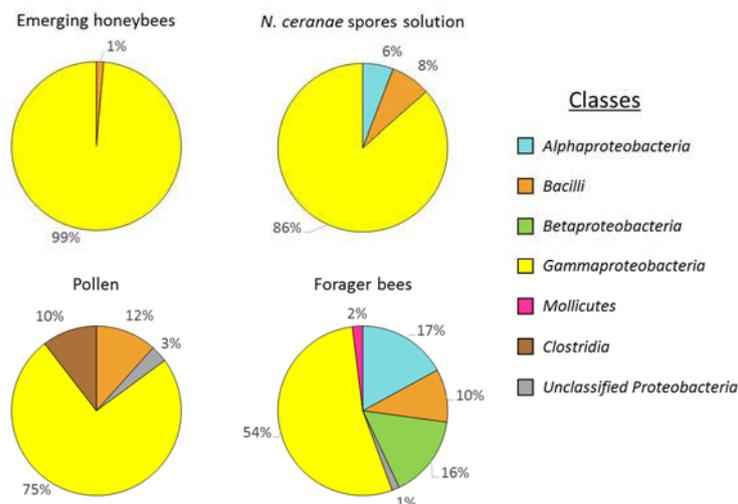


Figure 4. Relative abundances of different samples DNA at D0. At the emergence of bees, the bacteria of the mature intestinal microbiota were not established and principally dominated by *Gammaproteobacteria* (*Orbales* order). When the honeybees were inoculated with the *N. ceranae* spores solution, few bacteria were administered (3 342 detected reads) contrary to the pollen and the intestine crushed of foraging bees with 53 651 and 21 718 detected reads. Nevertheless, only 8.8% of pollen microbiota were active compared with 39.1% of the intestine crushed of foraging bee.

Implantation of the intestinal bacterial microbiota of honeybees kept in the cages

969 384 reads were obtained by massive sequencing. Surprisingly, we obtained globally more 16S DNA and cDNA reads in the five infected groups compared to the five uninfected groups at the two sampling times (excepted for cDNA samples at D10), and particularly at D17 where the number of sequences were multiplied by three between infected and uninfected groups (Figure 5). The microbiota was probably more active in FIP and BOSC groups at D10 as they contained the double of sequences compared to

all other groups. This trend was conserved at D17 in uninfected groups among which FIP and BOSC had approximately 1.5-fold more sequences than the control, NAC and THIAM groups. Finally, bacteria seemed more active at D10 comparatively to D17 with a sequence numbers of 516 592 and 300 090 respectively concerning the class analysis. As the differences of sequence amounts between groups could lead to bias when comparing the ten experimental groups, our data were presented considering the relative abundances (number of reads for a specific taxon/total reads).

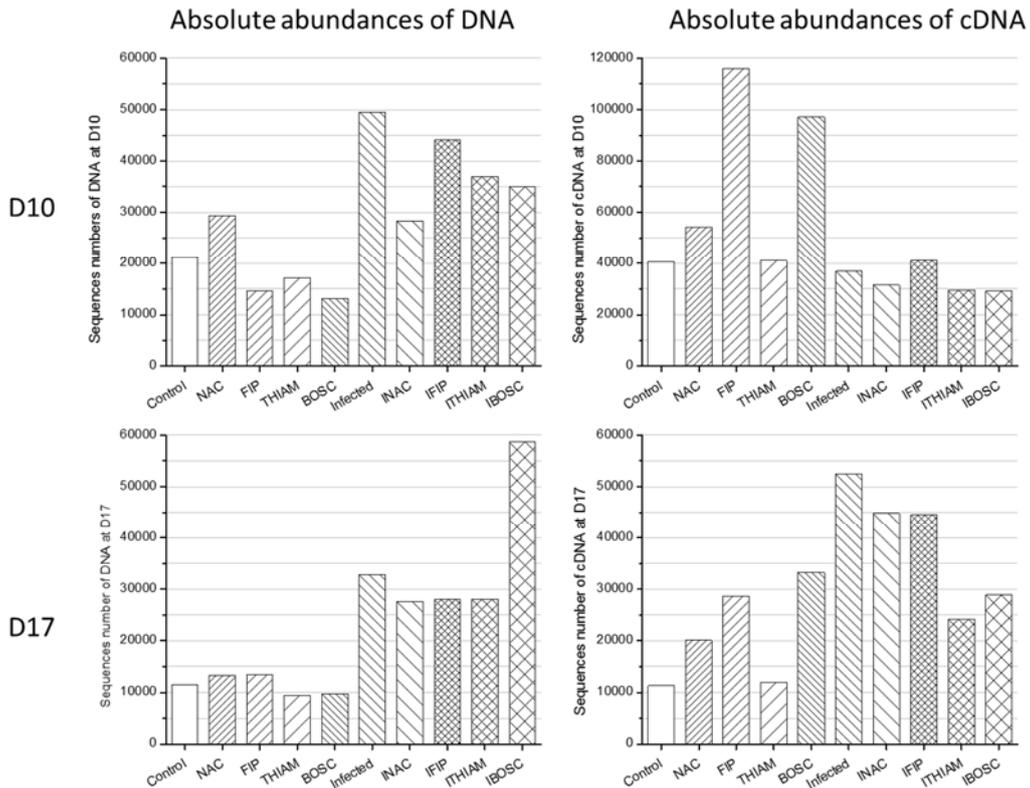


Figure 5. Absolute abundances of DNA and cDNA sequences at D10 and D17. 60 samples of 6 bees each (10 conditions x 3 replicates x 2 times of sampling) were sequenced. The bars represent the total numbers of sequences for each condition.

The affiliation of sequences to a class, an order, and sometimes a family or a genus was summarised in Table S2. At D10, the microbiota of the control group was composed of *Alphaproteobacteria* (*Rhizobiales* and *Rhodospirillales* orders) (10.6%), *Betaproteobacteria* (*Neisseriales* order) (12.8%), *Gammaproteobacteria* (mostly dominated by the *Orbales* order at around 97%) (57.5%) and *Bacilli* (*Lactobacillales* order) (19.1%). These bacterial classes were the same at D17, but in different proportions: the amount of *Alphaproteobacteria* sequences was significantly increased by 2.3 fold, due to a rise of *Rhizobiales* order, while the *Gammaproteobacteria* significantly decreased of 1.5-fold ($p < 0.05$) (Figure 6). The *Betaproteobacteria* and *Bacilli* seemed to conserve the same proportion between D10 and D17 (13.8 ± 0.5 and $20.5 \pm 1.2\%$ respectively). At D17, different orders could be identified in these classes: *Rhodospirillales* (3.8%) and *Rhizobiales* (21.6%, including *Bartonella*) in

Alphaproteobacteria, *Nesseriales* in *Betaproteobacteria*, 37.7% of *Orbales* in *Gammaproteobacteria* and *Bacillales* in *Bacilli*.

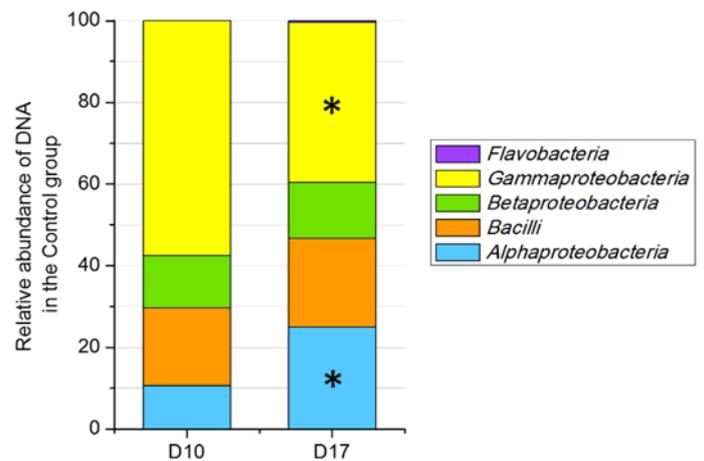


Figure 6. D10 and D17 relative abundances of DNA in the Control group. A Mann-Whitney test was applied and showed a significant difference in *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* abundances between D10 and D17 of experiments.

Honeybee gut dysbiosis induced by *N. ceranae* and pesticide expositions

The main significant variations concerning the gut microbiota composition was observed at D17 (Figure 7), and particularly when comparing data from the cDNA sequence analysis.

The *Alphaproteobacteria* activity, in particular those of the *Rhizobiales* order, decreased in infected group (Infected) and those bacteria were significantly less active in the four infected-treated groups (3.0-fold less in INAC, 4.6-fold in IFIP, 2.8-fold in ITHIAM and 3.3-fold IBOSC) compared to the control group which this order represented 36.2% of relative abundance of cDNA sequences ($p \leq 0.05$). Although a decrease was observed in NAC and FIP groups, this was not statistically significant. On the other hand, the thiamethoxam and the boscalid did not seem to influence the activity of this class in the uninfected bees (THIAM and BOSC).

On the contrary, the *Gammaproteobacteria* (mostly *Orbales* order) activity increased in infected groups, but only significantly when honeybees were co-exposed to *N. ceranae* and

molecules with approximately $57.0 \pm 1.6\%$ of relative abundance of cDNA sequences in INAC, IFIP, ITHIAM and IBOSC, and 45.4 and 28.7% in infected and control groups, respectively.

The presence of *Clostridia* (*Clostridiales* order) was detected in the five infected groups (DNA analysis) but they were significantly more active only in the infected group (cDNA analysis) at D17. According to DNA and cDNA analysis, the presence of *Betaproteobacteria* (mainly *Neisseriales* order) did not vary between conditions ($13.5 \pm 2.3\%$ for DNA and $5.7 \pm 1.7\%$ for cDNA) of total relative abundance and the cDNA sequences were very similar among them.

In the same way, *Bacilli* (represented by *Lactobacillales*) abundances were constant among groups with a mean of $20.1 \pm 2.9\%$ of the total DNA sequences. A particular genus, the *Spiroplasma* (*Mollicutes* class, *Entomoplasmatales* order) appeared exclusively in the infected group treated with the boscalid (IBOSC).

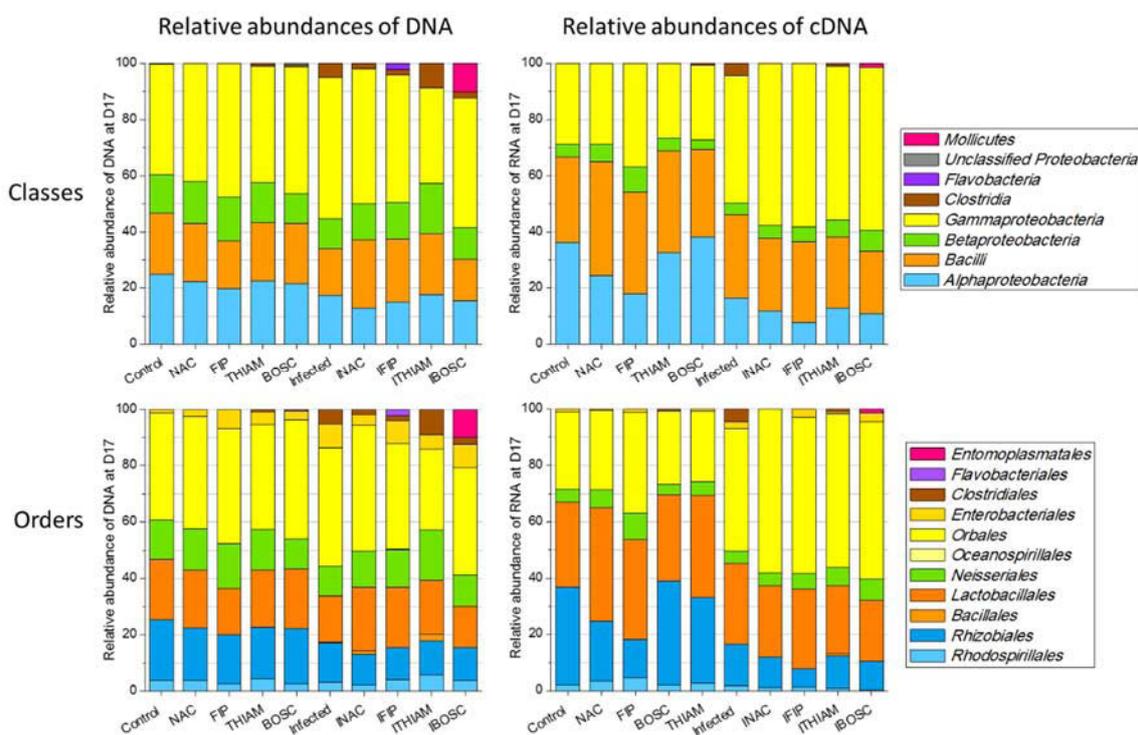


Figure 7. Relative abundances of bacterial DNA and RNA classes and orders in the different conditions at 17 days post-infection. The relative abundances of DNA sequences of the 10 experimental groups were reported at the left of the figure, and cDNA sequences at the right. Classes (top) and their respective orders (down) were represented. Details of the classes and orders names are indicated on the right.

Discussion

The fipronil chronically administered at 0.5 µg/L induced a significant mortality in honeybees, which was increased when honeybees were infected by *N. ceranae*, arguing for an additive effect of both stressors (see Table S1). This result was consistent with those observed in a previous study using fipronil in similar conditions (Paris *et al.*, 2017). This was not the case with thiamethoxam at 1.5 µg/L, as the presence of *N. ceranae* did not increase lethality. These results are in agreement with a previous study, showing also that thiamethoxam did not increase the mortality rate in *N. ceranae*-infected honeybees, even if the administered dose was higher than the one used in our study (Gregorc *et al.*, 2016). The ingestion of boscalid at 100 µg/L did not have an impact on the honeybee survival. Nevertheless, we found that the mortality rate at D22 was increased 2.3-fold in infected and boscalid-exposed bees (IBOSC) compared to control or BOSC groups, and increased 1.5-fold compared to the infected group. This effect was synergic during the most part of the experiment (from D8 to D17). Many studies have shown that *N. ceranae*, like the other microsporidia, are dependant of the ATP produced by the host cell and causes recruitment of host mitochondria, leading to physiological perturbations (Higes *et al.*, 2007; Tsaousis *et al.*, 2008; Hacker *et al.*, 2014). Indeed, Hacker *et al.* (2014) have detected a 20% decrease in performance in the mitochondria of *E. cuniculi*-infected cells compared to non-infected cells, using JC-1 dye that measures mitochondrial activity. Moreover, boscalid targets the complex II of the mitochondrial respiratory chain, including the fungi mitochondria, but does not seem to be enough discriminating to spare those of bees. So, the combination of *N. ceranae* and this pesticide could disrupt so much the energetic metabolism that it could result in a faster insect death.

Surprisingly, the addition of the antioxidant N-acetylcysteine seemed to improve the survival of infected honeybees (INAC), and even had a better

score than uninfected treated bees (NAC). However, in Paris *et al.* (2017), no difference was observed between infected-NAC and uninfected-NAC groups. The difference between these two studies may be due to the implantation of the microbiota, while in Paris *et al.* (2017) emerged bees had not been supplemented with foragers microbiota. So we can suppose that N-acetylcysteine combined with a natural microbiote implantation may improve the defences of honeybees. It would be interesting to test this hypothesis on colonies owning a natural microbiota.

The apparition of *Siproplasma* genus (*Mollicutes* class) could be an indicator of the survival collapse of the infected-boscalid group (IBOSC), since it is known to be pathogen, notably the species *S. apis* (although we did not identify the species) in honeybees (Mouches *et al.*, 1984). This pathogen could be found, in some cases, in association with a *Nosema* infection (Runckel *et al.*, 2011). But, the nature of the relationship between *S. apis* and the honeybee is not very clear (Schwarz *et al.*, 2014) and the question to know why this species had colonized the gut of infected-boscalid bees remains unsolved.

Unlike other animal species, the honeybee gut microbiota displays a low bacterial diversity. The core microbiota, *i.e.* the microbiota conserved between all individuals, accounts for 95% of the bacterial microbiota species and consists of only 9 species distributed in 5 classes or phyla: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* (*Snodgrassella alvi* specie belonging to *Neisseriales* order), *Gammaproteobacteria* (*Orbales* order including *Gilliamella apicola* and *Friscella perrara* species), *Actinobacteria* (*Bifidobacterium asteroides*) and *Firmicutes* (*Firm-4* and *5* species belonging to *Lacobacillaceae* order). At the emergence, the gut of adult is relatively poor in bacteria (Kwong and Moran, 2015).

The intestinal microbiota implantation of our caged honeybees has been certainly strengthened by the feeding with the intestinal

microbiota from foraging bees two days before infection, as 39.1% of the obtained sequences from this sample appeared to be active. The part of microbiota transferred to emerging bees by trophallaxy from adults which were introduced at the beginning of the experimentation, is difficult to evaluate. But both methods have certainly contributed to the implantation of microbiota in artificial conditions, as we obtained a similar microbiota in caged-bees than in bees from hives.

The intestinal bacteriome of bees, in our study, was mainly dominated by sequences derived from *Firmicutes* (*Bacilli* and *Clostridia*), and *Proteobacteria* (*Alpha-*, *Beta-* and *Gammaproteobacteria*) as it was observed in other studies, independently to the treatment administrated to honeybees (Martinson *et al.*, 2012; Crotti *et al.*, 2013; Corby-Harris *et al.*, 2014; Kakumanu *et al.*, 2016).

However, a great variation of sequences data between the three pools in each condition was observed despite the fact that each pool contained the homogenate of six honeybee guts. This variability could hide many statistical differences. Indeed, although the bacterial core is very stable from one colony to another, it exist a relative variability of abundance of the microbiota within a colony which is composed of bees from different genetic origin (Moran *et al.*, 2012). Moreover, in our study, we used emerging bees from three different hives in each cage which could explain the great variability between our samples inside the experimental conditions.

N. ceranae has modified the abundance of bacterial taxa of the intestinal microbiota. Indeed, the activity of *Rhizobiales* order (*Alphaproteobacteria*) decreased in the honeybee group infected by *N. ceranae* (Infected) and this effect was emphasized when infected bees were chemically treated (INAC, IFIP, ITHIAM and IBOSC). However, none of the treatments seemed to impact this order more greatly than the others. *Rhizobiales*, which are associated to the *Alpha-1* clade (Martinson *et al.*, 2011; Moran, 2015) are commonly present in the root system

of plants and allow to provide nitrogen sources to plants by fixing atmospheric nitrogen (N₂). Gut and root bacteria may share commonalities in term of functions (enhancing host metabolic capacities, competing with pathogens,...) (Ramírez-Puebla *et al.*, 2013). *Rhizobiales* could therefore play a similar role in intestine than in plant root system. Moreover, a study on the intestinal microbiota of ants highlighted the important role of *Rhizobiales* in the nutrition, notably with the supply of nitrogen source for ants. Authors had hypothesized that *Rhizobiales* would be involved in the herbivory comporment (Russell *et al.*, 2009).

Contrary to *Alphaproteobacteria*, the *Gammaproteobacteria* activity increased significantly in honeybees co-exposed to *N. ceranae* and molecules. *Gammaproteobacteria*, which are involved in the synthesis of vitamin B12, participate in the synthesis of amino acids which are then incorporated into intestinal cells (Engel and Moran, 2013b). Previous studies had demonstrated that *Gammaproteobacteria* were involved in the formation of biofilm on the intestinal epithelium and in the formation of type IV pili allowing interactions with the host. Bacterial genera *Snodgrassella* and *Gilliamella* have been shown to increase in bees parasitized by *Crithidia bombi*, a trypanosome protozoa of arthropods (Engel *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2012). The authors hypothesized that *Gammaproteobacteria* would limit the invasion of host intestine by a barrier effect. These bacteria also play an important role in nutrition since they are involved in the sugar metabolism (Engel and Moran, 2013b), the degradation of macromolecules derived from plants (*e.g.* lignin and pectin) (Engel *et al.*, 2012), and the aerobic oxidation of fermentation end products (Kwong *et al.*, 2014). We can thus hypothesize that this increase may have, concomitantly with perturbations of other bacterial communities, led to a non-reversible microbial balance breach, whatever the effects of bacterial communities on each other.

Clostridiales were present in the five infected groups, and vary significantly only in the infected group. It was possible that *Clostridiales* were brought with the pollen and the infection of *N. ceranae* would be a factor favouring their development in the intestinal ecological niche, explaining partly the observed mortalities. Absolute abundances, revealed that, globally, the bacterial microbiota was more present in infected groups, at D10 and this is all the more true at D17. But cDNA sequences permitted to see that the microbiota was more active when uninfected bees were treated with fipronil (FIP) or boscalid (BOSC). A study in which the midgut microbiota of the pests *Plutella xylostella* has been sequenced highlighted that the microbiota could play a role in the insecticide resistance, including against fipronil (Xia *et al.*, 2013). Our results could therefore be explained by a response of the bacterial microbiota activity for the detoxification of both fipronil and boscalid and may be specific to these molecules.

Globally, the antioxidant N-acetylcysteine treatment did not have an impact on the microbiota formation in uninfected or infected bees, although it appeared to improve the survival of infected bees and was not observed previously (Paris *et al.*, 2017). It has negatively aggravated the *N. ceranae* effect on the *Alphaproteobacteria* (*Rhizobiales*) activity like fipronil, thiamethoxam and boscalid and was the only treatment which impacted negatively the presence of *Alphaproteobacteria* in infected bees. This antioxidant is commonly used on insect oxidative stress studies (Sun *et al.*, 2012; Cousin *et al.*, 2013; Paris *et al.*, 2017). Used in animal health, the N-acetylcysteine seems to have a positive effect on the intestinal microbiota of piglets by maintaining a good redox status in a stress condition, by a reducing of the levels of free radicals and lipid peroxidation which could alter the microbiota, and by restoring the antioxidant enzymes activities. Moreover, N-acetylcysteine improved the development of good bacteria like *Bifidobacterium* compared to untreated

unstressed piglets or prevented the loss of beneficial communities as *Lactobacillus* (Xu *et al.*, 2014). However, insect intestinal microbiota is poorer than the mammal one, and we can hypothesize that the N-acetylcysteine, in the 1 mM concentration, had no effect on the honeybee microbiota. Studies in cell cultures have shown a protective effect of cells against pro-oxidant like oxygen peroxide H₂O₂ or fipronil when N-acetylcysteine was used simultaneous (Ki *et al.*, 2012; Xiao *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2016). So it would be interesting to apply the combination N-acetylcysteine/pesticides on honeybees in order to find out if the antioxidant could limit their negative effects on the microbiota and if they fail to improve the health of the intoxicated bees.

Conclusion

The environment can play an important role in the constitution and the evolution of microbiota. For example, Maes *et al.* (2016) have shown that the nature of food (fresh vs aged pollen) can significantly disturb the microbiota, increase the bee mortality and permit to the pathogen *Frischella perrara* to invade the gut (Maes *et al.*, 2016).

In our study, the presence of the microsporidia parasite *N. ceranae* seemed to disturb more significantly the intestinal microbiota than the chemical molecules, enabling the establishment of a dysbiosis which can be defined as non-beneficial shifts in microbiota community composition. However, dysbiosis could weaken the host resistance to pathogen colonization, so it might contribute to the *N. ceranae* infection. Indeed, Maes *et al.* (2016) demonstrated that more *Nosema* spp. spores were accounted in honeybees with a diet-induced intestinal dysbiosis, arguing that a dysbiosis could contribute to the *Nosema* establishment. Finally, we suppose that the presence of *N. ceranae* might disturb the commensal intestinal microbiota, and this disturbance might facilitate

the *N. ceranae* invasion, increasing the intestinal disorder.

On the contrary, different honeybee endogenous bacteria have permitted to resist to *Nosema* development, as example *Parasacharibacter apium*, an *Alphaproteobacteria Rhodospirillales* bacteria. This bacteria administered from the larval stage allowed to decrease the spore load of approximately 2-fold 10 days after the emergence (Corby-Harris *et al.*, 2016). In our study, the relative abundances of *Rhodospirillales* DNA sequences were lower in all groups at D17 comparatively to D10, and were lower in the five infected groups compared to uninfected groups which could be correlated to the *Nosema* proliferation.

Finally, it seems difficult to explain how *N. ceranae* can induce these modulations of the intestinal honeybee microbiota as the parasite development is mainly intracellular and rarely in contact with the flora. Deciphering such a mechanism will constitute a main challenge to understand the implication of gut microbiota in honeybee health, especially in the case of nosemosis.

References

- Ahn, J.-H., Hong, I.-P., Bok, J.-I., Kim, B.-Y., Song, J., and Weon, H.-Y. (2012) Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *J. Microbiol.* **50**: 735–745.
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., et al. (2010a) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Env. Microbiol.* **12**: 774–782.
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., et al. (2010b) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* **12**: 774–82.
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., and Di Gioia, D. (2016) Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 9469–9482.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Env. Microbiol.* **11**: 2284–2290.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., et al. (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., and Blot, N. (2014) Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* **9**: e91686.
- Avenot, H.F. and Michailides, T.J. (2007) Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. *Am. Phytopathol. Soc.* **91**: 13451350.
- Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J.C., and Gauthier, M. (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J. Insect Physiol.* **55**: 1099–1106.
- Campbell, J., Kessler, B., Mayack, C., and Naug, D. (2010) Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit? *Parasitology* **137**: 1487–91.
- Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G. a, Brunet, J.-L., and Badiou-Beneteau, A. (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* **32**: 2117–24.
- Casida, J.E. and Durkin, K.A. (2012) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* **58**: 99–117.
- Corby-Harris, V., Maes, P., and Anderson, K.E. (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS One* **9**: e95056.
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C.A.D., Naldo, R., Mott, B., and Anderson, K.E.

- (2016) *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *Apic. Soc. Insects* **109**: 537-.
- Cousin, M., Silva-Zacarin, E., Kretzschmar, A., El Maataoui, M., Brunet, J.-L., and Belzunces, L.P. (2013) Size changes in honey bee larvae oenocytes induced by exposure to Paraquat at very low concentrations. *PLoS One* **8**: e65693.
- Cox-foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N. a, et al. (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* (80-.). **318**: 283–287.
- Crotti, E., Sansonno, L., Prosdocimi, E.M., Vacchini, V., Hamdi, C., Cherif, A., et al. (2013) Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *N. Biotechnol.* **30**: 716–22.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., et al. (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera* . *PLoS One* **7**: e37017.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., et al. (2010) *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* **36**: 522–525.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., et al. (2013) Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* **113**: 42–51.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., and Tchamitchian, S. (2016) Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Sci. Rep.* 1–7.
- Engel, P., Martinson, V.G., and Moran, N.A. (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 11002–7.
- Engel, P. and Moran, N.A. (2013a) Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes* **4**: 60–65.
- Engel, P. and Moran, N.A. (2013b) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 699–735.
- Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **103**: S73–S79.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., and Spivak, M. (2013) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PLoS One* **8**: e58165.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., and Rotheray, E.L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**: 1255957.
- Gregorc, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Carvalho, S.M., Kramberger, D., Teixeira, E.W., and 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.
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., and Lucocq, J. (2014) Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* : direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. *Cell. Microbiol.* **16**: 565–579.
- Hainzl, D., Cole, L.M., and Casida, J.E. (1998) Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfanyl Photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* **11**: 1529–1535.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* **94**: 211–7.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A. V, Barrios, L., et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Env. Microbiol* **10**: 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., and Meana, A. (2010) Review article *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* **41**: 375–392.
- Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian

- parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* **92**: 93–5.
- Holt, H.L., Aronstein, K. a, and Grozinger, C.M. (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.
- Kakumanu, M.L., Reeves, A.M., Anderson, T.D., Rodrigues, R.R., and Williams, M. a (2016) Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Front. Microbiol.* **7**: 3389–1255.
- Ki, Y.-W., Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C., and Koh, H.C. (2012) Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol. Lett.* **211**: 18–28.
- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. (2011) Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods* **84**: 81–87.
- Kwong, W.K., Engel, P., Koch, H., and Moran, N.A. (2014) Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**.
- Kwong, W.K. and Moran, N.A. (2015) Evolution of host specialization in gut microbes: the bee gut as a model. *Gut Microbes* **6**: 214–220.
- Kwong, W.K. and Moran, N.A. (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 374–384.
- Lee, F.J., Rusch, D.B., Stewart, F.J., Mattila, H.R., and Newton, I.L.G. (2015) Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environ. Microbiol.* **17**: 796–815.
- Leonhardt, S.D. and Kaltenpoth, M. (2014) Microbial communities of three sympatric Australian stingless bee species. *PLoS One* **9**: e105718.
- Maes, P.W., A.P.Rodrigues, P., Oliver, R., Mott, B.M., and Anderson, K.E. (2016) Diet Related Gut Bacterial Dysbiosis Correlates with Impaired Development, Increased Mortality and *Nosema* Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Mol. Ecol.* 5439–5450.
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., and Moran, N.A. (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* **20**: 619–628.
- Martinson, V.G., Moy, J., and Moran, N.A. (2012) Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 2830–2840.
- Mayack, C. and Naug, D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* **100**: 185–188.
- Moran, N.A. (2015) Genomics of the honey bee microbiome. *Curr. Opin. Insect Sci.* **10**: 22–28.
- Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., and Sabree, Z.L. (2012) Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One* **7**: 1–10.
- Mouches, C., Bové, J.M., and Albisetti, J. (1984) Pathogenicity of *Spiroplasma apis* and other spiroplasmas for honey-bees in Southwestern France. *Ann. l’Institut Pasteur / Microbiol.* **135**: 151–155.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L., and Yeh, J.Z. (2009) Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic. Biochem. Physiol.* **97**: 149–152.
- Paris, L., Roussel, M., Pereira, B., Delbac, F., and 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.*
- Powell, J.E., Martinson, V.G., Urban-Mead, K., and Moran, N.A. (2014) Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 7378–7387.
- Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010) FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* **5**: e9490.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible

- with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35**: 7188–96.
- Ramírez-Puebla, S.T., Servín-Garcidueñas, L.E., Jiménez-Marín, B., Bolaños, L.M., Rosenblueth, M., Martínez, J., et al. (2013) Gut and root microbiota commonalities. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2–9.
- Romero, A., Ramos, E., Ares, I., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., et al. (2016) Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicol. Lett.* **252**: 42–49.
- Roussel, M., Villay, a, Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., et al. (2015) Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nosemosis. *Carbohydr. Polym.* **133**: 213–220.
- Runkel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., and DeRisi, J.L. (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS One* **6**: e20656.
- Russell, J.A., Moreau, C.S., Goldman-Huertas, B., Fujiwara, M., Lohman, D.J., and Pierce, N.E. (2009) Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 21236–21241.
- Sabree, Z.L., Hansen, A.K., and Moran, N.A. (2012) Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS One* **7**:
- Schwarz, R.S., Teixeira, É.W., Tauber, J.P., Birke, J.M., Martins, M.F., Fonseca, I., and Evans, J.D. (2014) Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. *Microbiologyopen* **3**: 341–355.
- Smith, M.L. (2012) The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS One* **7**: 1–6.
- Sun, X., Komatsu, T., Lim, J., Laslo, M., Yolitz, J., Wang, C., et al. (2012) Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **11**: 783–93.
- Taib, N., Mangot, J.-F., Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Phylogenetic Affiliation of SSU rRNA Genes Generated by Massively Parallel Sequencing: New Insights into the Freshwater Protist Diversity. *PLoS One* **8**: e58950.
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A. V, Lucocq, J.M., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **453**: 553–557.
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R.J., Flaberg, E., Szekely, L., and Olofsson, T.C. (2012) Symbionts as Major Modulators of Insect Health: Lactic Acid Bacteria and Honeybees. *PLoS One* **7**: e33188.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., 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.
- Xia, X., Zheng, D., Zhong, H., Qin, B., Gurr, G.M., Vasseur, L., et al. (2013) DNA Sequencing Reveals the Midgut Microbiota of Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.) and a Possible Relationship with Insecticide Resistance. *PLoS One* **8**: e68852.
- Xiao, Y., Li, X., Cui, Y., Zhang, J., Liu, L., Xie, X., et al. (2014) Hydrogen peroxide inhibits proliferation and endothelial differentiation of bone marrow stem cells partially via reactive oxygen species generation. *Life Sci.* **112**: 33–40.
- Xu, C.C., Yang, S.F., Zhu, L.H., Cai, X., Sheng, Y.S., Zhu, S.W., and Xu, J.X. (2014) Regulation of N-acetyl cysteine on gut redox status and major microbiota in weaned piglets 1. *J. Anim. Sci.* **92**: 1504–1511.

Table S1. P-values obtained between different conditions with statistical analysis on consumptions and survival data for honeybees. The survival was analysed with Cox-Mantel test.

Treatment conditions	Honeybee survival p-values	Spore production p-values
Ctrl vs NAC	0.053	-
Ctrl vs FIP	<0.001	-
Ctrl vs THIAM	0.005	
Ctrl vs BOSC	0.099	
Ctrl vs Inf.	0.001	-
Ctrl vs INAC	0.254	-
Ctrl vs IFIP	<0.001	-
Ctrl vs ITHIAM	<0.001	
Ctrl vs IBOSC	<0.001	
NAC vs FIP	0.025	-
NAC vs THIAM	0.436	
NAC vs BOSC	0.617	
NAC vs Inf.	0.199	-
NAC vs INAC	0.340	-
NAC vs IFIP	0.001	-
NAC vs ITHIAM	0.096	
NAC vs IBOSC	<0.001	
FIP vs Inf.	0.458	-
FIP vs THIAM	0.189	
FIP vs BOSC	0.003	
FIP vs INAC	0.002	-
FIP vs IFIP	0.117	-
FIP vs ITHIAM	0.730	
FIP vs IBOSC	<0.001	
THIAM vs BOSC	0.140	
THIAM vs Inf.	0.694	
THIAM vs INAC	0.072	
THIAM vs IFIP	0.012	
THIAM vs ITHIAM	0.450	
THIAM vs IBOSC	<0.001	
BOSC vs Inf.	0.041	
BOSC vs INAC	0.676	
BOSC vs IFIP	<0.001	
BOSC vs ITHIAM	0.013	
BOSC vs IBOSC	<0.001	
Inf. vs INAC	0.022	
Inf. vs IFIP	0.026	
Inf. vs ITHIAM	0.699	
Inf. vs IBOSC	<0.001	
INAC vs IFIP	<0.001	
INAC vs ITHIAM	0.007	
INAC vs IBOSC	<0.001	
IFIP vs ITHIAM	0.062	
IFIP vs IBOSC	0.018	
ITHIAM vs IBOSC	<0.001	

Tableau 1. Honeybee gut microbiota taxonomy. The taxonomy was based on the LCA analyse (Lowest Common Ancestor).

Phyla	Class	Order	Family	Genus
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Aeriscardovia</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	uncultured
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Williamsia</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Frankiales</i>	uncultured	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Yimella</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Frigoribacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Subgroup 4</i>	<i>Family Incertae Sedis</i>	<i>Blastocatella</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Thermoleophilia</i>	<i>Solirubrobacterales</i>		
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	<i>Fluviicola</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Capnocytophaga</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	uncultured
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	<i>Anaerolineales</i>	<i>Anaerolineaceae</i>	uncultured
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>	uncultured		
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcales</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Oceanobacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Virgibacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Gemella</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Listeriaceae</i>	<i>Listeria</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Paenibacillaceae</i>	
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Planococcaceae</i>	<i>Lysinibacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Dolosigranulum</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>

Bee gut microbiota with Nosema and fipronil

<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Fructobacillus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>		
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>			
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Garciella</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Anaerococcus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Incertae Sedis</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Parvimonas</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Peptoniphilus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Tepidimicrobium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	<i>Tissierella</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Family XI Incertae Sedis</i>	
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Incertae Sedis</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnoanaerobaculum</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>uncultured</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Peptostreptococcaceae</i>	<i>Incertae Sedis</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Incertae Sedis</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Selenomonas</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Negativicutes</i>	<i>Selenomonadales</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Veillonella</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>unclassified Firmicutes</i>			
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriia</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Leptotrichiaceae</i>	<i>Leptotrichia</i>
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetacia</i>	<i>Planctomycetales</i>	<i>Planctomycetaceae</i>	<i>uncultured</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Aurantimonadaceae</i>	<i>Aureimonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Bartonella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>DUNssu044</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>F0723</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>uncultured</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Microvirga</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Paracoccus</i>

Bee gut microbiota with *Nosema* and fipronil

<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	uncultured
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Saccharibacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	uncultured
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospirillales</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Novosphingobium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>			
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Lautropia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Aquabacterium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Massilia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Undibacterium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Snodgrassella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	<i>Phaselicystidaceae</i>	<i>Phaselicystis</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Myxococcales</i>	<i>Sandaracinaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Campylobacterales</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Aeromonadales</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Tolumonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Kluyvera</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Morganella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Proteus</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Providencia</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>GamII</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>HOC36</i>		
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Oleispira</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Oceanospirillales</i>	<i>Oceanospirillaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Orbales</i>	<i>Orbaceae</i>	<i>Gilliamella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Orbales</i>	<i>Orbaceae</i>	<i>Orbus</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Orbales</i>	<i>Orbaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Aggregatibacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Enhydrobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Perlucidibaca</i>

Bee gut microbiota with Nosema and fipronil

<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Psychrobacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Solimonadaceae</i>	<i>uncultured</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Luteimonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>			
<i>Proteobacteria</i>	<i>unclassified Proteobacteria</i>			
<i>Tenericutes</i>	<i>Mollicutes</i>	<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>

Chapitre 5 : Discussion générale

*“Le savant qui ne met pas en pratique son savoir
est une abeille qui ne donne pas de miel.”*

Proverbe persan

Les premières études menées sur les microsporidies remontent à plus de 160 ans, mais celles portant sur *Nosema ceranae*, une espèce parasitant l'abeille domestique *Apis mellifera*, ne datent que d'une vingtaine d'années. Dans l'attente pressante de réponses de la part du public, des autorités sanitaires et du monde apicole, les aspects fondamentaux de la relation *A. mellifera/N. ceranae* ont été abordés. En effet, l'étude des interactions entre un parasite et son hôte paraît primordiale afin de mieux cerner le dialogue instauré entre les deux, et acquérir une meilleure compréhension de la maladie, nécessaire pour la mise en place de moyens de lutte efficaces. Il est également important de considérer l'environnement du parasite dans son ensemble, c'est-à-dire ne pas considérer l'interaction *N. ceranae/A. mellifera* comme un échange uniquement bipartite, mais bien un échange tripartite où le microbiote intestinal de l'abeille pourrait également jouer un rôle majeur.

1. *Nosema ceranae*, *Apis mellifera* et stress oxydant

Plusieurs études ont montré que la réponse immunitaire de l'abeille tend à être inhibée au cours de l'infection par *N. ceranae*, et les systèmes immunitaires cellulaire et humoral de l'abeille ne semblent pas être efficaces pour lutter contre l'infection (Antúnez *et al.*, 2009; Alaux *et al.*, 2010; Chaimanee *et al.*, 2012; Goblirsch *et al.*, 2013a; Aufauvre *et al.*, 2014; Badaoui *et al.*, 2017).

De plus, il semblerait qu'une infection par *N. ceranae* augmente les capacités antioxydantes de l'abeille. En effet, une élévation de la quantité et de l'activité des enzymes antioxydantes (Alaux *et al.*, 2011; Vidau *et al.*, 2011a, 2014), mais aussi de l'expression de certains de leurs gènes (Dussaubat *et al.*, 2012) a été mesurée.

La première question était donc de savoir si cette modification des systèmes antioxydants pouvait être induite par une réponse immunitaire intestinale de l'abeille pour lutter contre l'infection, et/ou en réponse à un stress oxydant induit dans les cellules intestinales.

1.1. La réponse immunitaire intestinale est-elle déclenchée en réponse à l'infection par *N. ceranae* ?

Il a été montré chez d'autres insectes, et notamment chez la drosophile, qu'il existait une immunité dite intestinale, au niveau des cellules épithéliales. En effet, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) semble jouer un rôle dans la défense contre les bactéries pathogènes intestinales, *via* des enzymes appelées Dual oxydases (DUOX) localisées dans la membrane plasmique des cellules de l'épithélium intestinal. Au cours d'une infection intestinale, les DUOX sont activées par de l'uracile sécrété par des bactéries pathogènes. Bien que l'élément déclencheur et le mécanisme de sécrétion ne soient toujours pas bien compris à ce jour, cette libération d'uracile entraîne une augmentation de

l'expression des gènes codant pour DUOX. Une augmentation de la mobilisation des ions calcium stockés dans le réticulum endoplasmique des cellules intestinales, stimulant l'activité DUOX a également été constatée (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Kim & Lee, 2014; Lee *et al.*, 2015b). L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ généré est ensuite réduit en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ce dernier, s'il n'est pas réduit par une catalase de l'hôte, est transformé en présence d'ions chlorure Cl^- par une myéloperoxydase en acide hypochloreux HOCl, permettant de dégrader la membrane des microorganismes.

Des gènes codant pour une DUOX ont été identifiés dans le génome l'abeille (Kawahara *et al.*, 2007), et une seule étude semble avoir étudié son expression chez les abeilles d'hiver et d'été, sans montrer de différence notable (Ratiu *et al.*, 2016). Cependant, aucune information n'est disponible concernant l'expression de ce gène au cours d'une infection par *Nosema*, ou par d'autres pathogènes de l'abeille.

Dans le cadre d'une infection par *N. ceranae*, si une production d'uracile était effective, elle ne serait *a priori* pas générée par les microsporidies elles-mêmes, aucune donnée bibliographique n'ayant décrit une telle sécrétion par des spores microsporidiennes. Cependant, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la présence de *N. ceranae* dans la lumière intestinale pourrait perturber le microbiote intestinal de l'abeille, favorisant le développement de pathobiontes, qui pourraient être les déclencheurs de la réponse immunitaire intestinale *via* DUOX.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la sonde R19S, en nous basant sur un protocole utilisé chez la Drosophile. Cette sonde, administrée aux abeilles par voie orale, se fixe sur l'HOCl produit par l'activité DUOX des cellules intestinales (Lee *et al.*, 2013). Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été concluants, n'ayant détecté aucun marquage dans les intestins des abeilles. En outre, il semblerait que l'utilisation de cette sonde soit remise en question, la reproduction du protocole sur les drosophiles n'ayant pas été probante (Ferrandon D., communication personnelle).

N. ceranae étant un parasite à développement intracellulaire, nous nous sommes orientés sur l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'activité des systèmes antioxydants observée dans les études précédentes, serait davantage une conséquence d'une perturbation de l'homéostasie intracellulaire induite par la présence de *N. ceranae* plutôt qu'une réponse intestinale immunitaire. Nous avons ainsi entrepris de mesurer la quantité d'ERO au niveau intestinal, afin de voir s'il existait une perturbation de la balance oxydante au cours de l'infection par *N. ceranae*. La détection et la quantification des ERO s'avèrent être difficiles car les ERO sont des espèces particulièrement labiles. En outre, il est probable que la perturbation de la balance production/élimination des ERO soit effective uniquement dans les cellules infectées par *N. ceranae*, ce qui pourrait diluer les mesures dans

les premiers jours d'infection où toutes les cellules intestinales ne sont pas infectées. Ceci rend la détection et la quantification des ERO encore plus fastidieuses.

1.2. La présence de *N. ceranae* génère-t-elle une augmentation de la production des ERO dans les cellules intestinales de l'abeille ? L'infection est-elle responsable d'un déséquilibre de la balance pro- et antioxydants (Paris *et al.*, 2017) ?

Pour savoir si les cellules intestinales d'*A. mellifera* étaient susceptibles de produire des ERO au cours de l'infection par *N. ceranae*, la sonde fluorescente CM-H₂DCFDA, capable de pénétrer dans les cellules et de mettre en évidence les ERO présentes, a été utilisée sur des intestins d'abeilles infectées et non infectées. Parallèlement, j'ai effectué la quantification des peroxydes solubles tels que l'H₂O₂ par un dosage colorimétrique, puisque ces derniers semblent être les ERO les moins instables et les moins réactives. Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de *N. ceranae*, la quantité globale des ERO diminue, et notamment celle des peroxydes solubles.

La mesure des ERO restant difficile, j'ai également entrepris quantifier l'oxydation des protéines totales (modification irréversible entraînant leur élimination) des cellules de l'intestin des abeilles infectées ou non par *N. ceranae*, ainsi que l'oxydation des lipides. Les résultats ont montré une diminution de l'oxydation des protéines et des lipides. Afin de comparer avec les précédentes études portant sur la vitellogénine où les auteurs ont observé une diminution de l'expression du gène (Antúnez *et al.*, 2009; Goblirsch *et al.*, 2013a), il serait intéressant de mesurer le taux de vitellogénine oxydée dans l'hémolymphe des abeilles. En effet, cette protéine étant particulièrement sensible à l'oxydation (Seehuus *et al.*, 2006), il serait intéressant de connaître la proportion de Vg oxydée sur la totalité des protéines oxydées, afin de mieux comprendre son rôle chez l'abeille, lors d'une infection et/ou d'une exposition à un pesticide. Cependant, dans le cadre de mon expérimentation, il n'a pas été possible pour des raisons de temps et de moyens humains de réaliser ces prélèvements d'hémolymphe.

Il est à noter que l'oxydation des protéines a été analysée par une technique de Slot blot que j'ai mis au point, après avoir également testé une approche par SDS-PAGE. Cette technique présente l'avantage de quantifier plus aisément la quantité totale de protéines oxydées puisque l'ensemble des protéines de l'échantillon est analysé en un seul point de mesure. De plus, avec pas moins de 570 points d'échantillons, cela facilitait également l'analyse en séries des échantillons. Cependant, pour étudier plus finement l'oxydation d'une protéine en particulier, la technique SDS-PAGE est une solution envisageable.

De la même façon, l'infection par *N. ceranae* a engendré une diminution de la quantité de lipides oxydés, bien que cette tendance ne soit significative qu'à 14 jours après l'infection. N'ayant pas

suffisamment d'abeilles survivantes lors du dernier jour de prélèvement (J21), l'échantillonnage pour l'analyse des lipides n'a pu être réalisé, laissant en suspens la question de la quantité de lipides oxydés à ce temps de prélèvement.

Préalablement à ma thèse, lors de mon stage de Master 2, j'avais réalisé des marquages de la guanine oxydée, en utilisant un anticorps anti-8OHdG, dans le but de savoir si *N. ceranae* engendrait ou non une augmentation de l'oxydation de l'ADN. Ces analyses avaient été menées sur des coupes histologiques d'intestins. Cependant, la quantification de l'oxydation de l'ADN par cette technique avait donné des résultats très variables au sein d'une même condition, notamment chez les abeilles infectées. Ceci est probablement dû à la difficulté de produire des coupes homogènes d'un échantillon à un autre, c'est-à-dire, ayant été coupées dans la même zone de l'intestin et présentant la même quantité de cellules infectées d'une coupe à l'autre au sein d'un même échantillon. Reproduire cette expérimentation dans l'étude que nous avons publiée en 2017 aurait nécessité un trop grand nombre d'échantillons et, aux vues des problèmes techniques soulevés, semblait peu adaptée à la question posée. Pour évaluer l'état de dégradation général de l'ADN, le test des comètes, ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE), pourrait être utilisé. Le principe de ce test repose sur la microélectrophorèse de l'ADN des cellules sur gel d'agarose, suivi d'une coloration au Bromure d'Ethidium. L'évaluation des cassures dans l'ADN peut alors s'effectuer de manière semi-quantitative, par comparaison de la taille des comètes, ou de façon quantitative à l'aide d'un analyseur d'images spécifique.

141

Dans notre étude, les analyses statistiques ne montraient aucune corrélation entre la diminution de la quantité de peroxydes et la diminution de l'oxydation des protéines et des lipides dans les intestins d'abeilles infectées. Or, plusieurs études portant sur les systèmes antioxydants chez des abeilles infectées par *N. ceranae* ont globalement montré une augmentation de l'activité des systèmes de détoxification impliquant notamment la GST, la catalase ou encore une thiorédoxine-like (Vidau *et al.*, 2011a, 2014; Dussaubat *et al.*, 2012; Aufauvre *et al.*, 2014). Aussi, cette augmentation des antioxydants pourrait engendrer une forte diminution des pro-oxydants et donc de l'oxydation de leurs cibles telle que nous l'avons observé.

Comprendre pourquoi certains systèmes antioxydants de l'abeille tendent à être activés en présence de *N. ceranae* pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de développement du parasite. Deux hypothèses peuvent être émises : (i) soit le parasite induit une augmentation de la transcription de gènes codant pour les systèmes antioxydants dans le but de favoriser son propre développement. Il se protégerait ainsi des ERO potentiellement générées par la cellule pour se défendre ; (ii) soit cette augmentation est la conséquence de la forte dépendance énergétique de *N. ceranae* vis-à-vis des mitochondries de son hôte. En effet, *N. ceranae* détournant l'ATP produite par

les mitochondries de la cellule hôte, et ces dernières étant une source importante d'ERO, nous pouvons supposer qu'une augmentation du nombre et/ou de l'activité des mitochondries engendrerait une élévation de la production d'ERO. Dans un souci d'auto-défense, la cellule hôte augmenterait alors ses systèmes antioxydants. Une combinaison de ces deux hypothèses n'est toutefois pas à exclure.

Ainsi, afin de mieux cerner l'effet des microsporidies sur la production d'ERO dans la cellule hôte et dans le but de comprendre si l'activité mitochondriale pourrait être directement liée à cette production, j'ai initié des expérimentations sur un modèle de cultures de cellules *in vitro*. En effet, la culture cellulaire permet de simplifier le modèle d'étude pour répondre aux questions posées, et de peut-être mieux interpréter les résultats obtenus *via* les expérimentations sur abeilles.

1.3. Les microsporidies cultivées *in vitro* induisent-elles un stress oxydant (Chapitre 3) ?

Afin de mieux comprendre l'impact des microsporidies sur le stress oxydant, j'ai travaillé sur une autre espèce microsporidienne (*Encephalitozoon cuniculi*) maintenue au laboratoire sur des cellules fibroblastiques humaines (HFF). En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucun moyen efficace pour cultiver *N. ceranae in vitro* et aucune lignée cellulaire d'abeilles n'est commercialisée.

Nous avons choisi d'exprimer nos résultats en faisant le ratio du pourcentage d'ERO produites en fonction du pourcentage de cellules viables. Nous avons constaté que la présence du parasite engendrait une légère augmentation de la production d'ERO d'environ 10% à 24h et 48h après infection des cellules HFF avec *E. cuniculi*. Or, chez les abeilles infectées par *N. ceranae* nous n'avons observé aucune différence à 24h et au contraire, une diminution des ERO à 48h post-infection.

Bien qu'il soit difficile de faire le parallèle entre le modèle abeille *in vivo* et la modèle de culture *in vitro*, plusieurs points peuvent expliquer ces variations :

- (i) les différences entre les deux modèles (échelle d'étude, type de cellules hôtes et espèces microsporidiennes) génèrent des réactions différentes dans les cellules ;
- (ii) lors de l'infection, les cellules en culture sont directement mises en contact avec les spores d'*E. cuniculi*, et sont donc susceptibles d'être infectées en quelques minutes. A *contrario*, les spores de *N. ceranae* sont inoculées *per os*. Les cellules intestinales ne sont donc pas immédiatement en contact avec les microsporidies, nécessitant une migration des spores à travers tout le tube digestif, dont le jabot où elles peuvent rester en suspens plusieurs heures, voire régurgitées par trophallaxie, avant de passer la valve proventriculaire (Annexe 2) ;
- (iii) l'infection des cellules intestinales étant plus lente, il est possible que les cellules soient plus réactives en produisant plus rapidement ou en plus grande quantité des antioxydants

que les cellules en cultures. Pour répondre à cette question, il serait nécessaire de mesurer les antioxydants aux différents temps de prélèvements sur nos deux modèles d'études *in vivo* et *in vitro*.

J'ai ainsi testé un protocole de quantification des superoxydes dismutases dans les cellules HFF infectées ou non par *E. cuniculi*, mais les résultats obtenus n'étaient pas exploitables et le protocole aurait nécessité davantage de mise au point avant d'effectuer de nouvelles mesures. La mesure de l'activité de la catalase est également une piste à explorer.

1.4. Comment la co-exposition *N. ceranae*/fipronil influence-t-elle la production d'ERO ?

L'équipe IHP, dans laquelle ma thèse s'est déroulée, a montré que lorsque les abeilles étaient infectées par *N. ceranae* et exposées chroniquement à une dose sub létale de l'insecticide fipronil (1 µg/L), un effet synergique de la mortalité des abeilles était observé, se traduisant par une augmentation plus importante de la mortalité des abeilles co-exposées aux deux facteurs de stress (Vidau *et al.*, 2011a; Aufauvre *et al.*, 2012). De la même façon, lors de deux autres expérimentations menées au laboratoire, avant ma propre expérimentation, où une dose chronique de fipronil à 0,5 µg/L a été utilisée, une synergie de mortalité avait également été mesurée, parfois sur quelques jours. Ceci avait donc permis de déterminer le choix de la dose de fipronil que j'ai moi-même utilisée, à savoir 0,5 µg/L.

143

Cependant, l'effet synergique à l'une ou l'autre de ces concentrations n'est pas toujours constaté. Ce fut notamment le cas notamment lors de mes propres travaux, puisqu'en effet, sur l'ensemble de mes expérimentations, les abeilles intoxiquées chroniquement au fipronil présentaient une mortalité d'en moyenne $38 \pm 2\%$, toujours significativement plus importante que les abeilles non traitées, dont la mortalité atteignait environ $14 \pm 4\%$. Mais aucune synergie de mortalité n'a été observée lors de la co-exposition *N. ceranae*/fipronil.

Il est probable que la diversité des protocoles d'infection et d'intoxication, des souches d'abeilles utilisées, l'état de santé sous-jacent des colonies dans lesquelles les abeilles sont prélevées, soient des facteurs responsables des variabilités observées entre les expérimentations.

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes demandé si l'effet additionnel sur la mortalité des abeilles observé lors de la co-exposition pourrait être dû à une aggravation du stress oxydant généré. Afin de comparer l'effet du fipronil, considéré comme pro-oxydant (Vidau *et al.*, 2011b; Ki *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2016) sur la balance oxydative, j'ai testé en parallèle sur des groupes d'abeilles infectées ou non par *N. ceranae*, l'antioxydant N-acétylcystéine en administration chronique à raison d'une concentration de 1 mM.

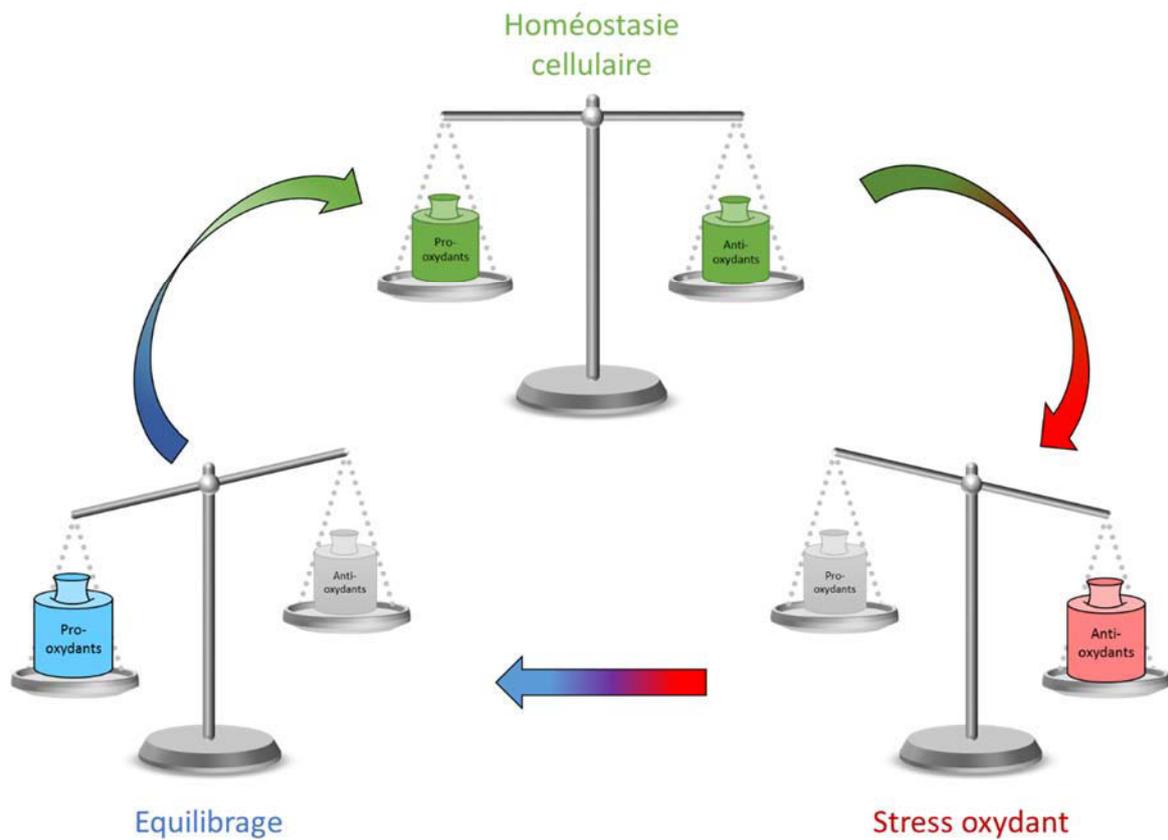


Figure 55. Schéma conceptuel du fonctionnement de la balance oxydante. Lorsqu'une cellule parvient à maintenir un équilibre de son milieu intérieur malgré les contraintes externes et internes, celle-ci est dite en homéostasie. La balance pro-/anti-oxydante est alors équilibrée. En cas de déséquilibre, par exemple en faveur des antioxydants, la cellule va compenser, soit en produisant un excès de pro-oxydants, soit en réduisant leur élimination, afin de retrouver à terme un état d'homéostasie.

1.4.1. Pourquoi les antioxydants n'engendrent-ils pas forcément une diminution des ERO ?

En culture *in vitro*, j'ai choisi d'utiliser l'acide ascorbique (Asc ou vitamine C) après avoir testé la N-acétylcystéine puisque celle-ci n'a semblé avoir aucun effet sur le modèle *E. cuniculi*/HFF. La vitamine C est un antioxydant non-enzymatique permettant l'élimination des radicaux selon la réaction : $Asch^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow Asc^{\cdot} + ROOH$. L'Asc[•] ainsi formé sera lui-même régénéré par une NAD(P)H réductase. La vitamine C peut également participer à la régénération de l'α-tocophérol (vitamine E) radicalaire, ou du glutathion oxydé (GSSG) (Lü *et al.*, 2010). La N-acétylcystéine est quant à elle un précurseur du glutathion, mais aussi elle-même un antioxydant *via* les groupements thiols qui la composent, susceptibles d'être facilement oxydés.

En culture cellulaire, la vitamine C n'engendrait pas de différence de viabilité entre les cellules non infectées et celles infectées par *E. cuniculi*. Aucune augmentation de la production d'ERO n'a été constatée à 24h, mais une augmentation à 48h avec la plus faible concentration (0,5 μM) a toutefois été mesurée. Il serait intéressant de voir si à cette même dose l'écart de production d'ERO entre les cellules infectées et non infectées se maintient ou non au cours du temps. Fait intéressant, dans cette expérimentation nous avons constaté un fort effet-dose dépendant de la vitamine C sur la production des ERO : plus la vitamine C est concentrée, moins il y a de ERO (Chapitre 3, Figure 3E et 3F). Curieusement, nous avons observé une très forte augmentation de la viabilité des cellules HFF après traitement à la vitamine C. Or, une étude a montré que la vitamine C semblait atténuer la sénescence cellulaire des cellules somatiques humaines et de souris et aidait à la génération rapide de nouvelles cellules (Esteban *et al.*, 2010). Ainsi, la vitamine C pourrait participer à la prolifération cellulaire et ceci pourrait être l'explication de l'augmentation de viabilité que nous observons dans les cellules HFF avec un effet dose dépendant de la concentration en vitamine C utilisée (Chapitre 3, Figure 1).

Concernant l'expérimentation que j'ai menée sur les abeilles, nous avons constaté que l'antioxydant N-acétylcystéine n'avait pas de conséquence sur la survie des abeilles, ni sur la charge parasitaire. Étonnamment, la quantité de peroxydes solubles augmentait au cours du temps. Ceci permet d'émettre l'hypothèse suivante basée sur le principe d'équilibrage de la balance oxydante (Figure 55). En effet, lorsque l'équilibre pro-/antioxydant est rompu, en faveur des antioxydants dans notre cas, *via* un apport constant d'antioxydants, la cellule tend à être déficitaire en pro-oxydants. Ainsi, il est possible que la cellule compense ce déficit en ERO (puisqu'elles sont nécessaires à de nombreuses fonctions cellulaires) en augmentant la synthèse de pro-oxydants, et notamment les peroxydes solubles. Cependant même si la concentration en peroxydes solubles augmente, en présence de N-acétylcystéine, la quantité de protéines oxydées est réduite de moitié 22 jours après le

début du traitement par rapport au contrôle (Paris *et al.*, figure 8 B.2). Ceci pourrait montrer que cet antioxydant semble jouer un rôle protecteur du stress oxydant sur la cellule.

1.4.2. Le fipronil modifie-t-il la production des ERO ? Qu'en est-il lorsque les cellules sont infectées par une microsporidie ?

En présence de fipronil, nous avons constaté un fort effet-dose sur la production des ERO par les cellules HFF non infectées après 24h de traitement, effet qui n'était pas observé pour les cellules infectées par *E. cuniculi*. En effet, plus la dose de fipronil administrée était élevée, plus la production d'ERO était importante (Chapitre 3, Figure 3A). Par conséquent, la quantité d'ERO produites était toujours plus importante dans les cellules non infectées.

Cependant, l'effet dose observé à 24h sur les cellules non infectées est moins marqué à 48h. De plus, aux faibles concentrations de fipronil (0,5 et 5 μM) la viabilité des cellules est plus importante à 48h qu'à 24h. Nous supposons donc, qu'après 24h d'exposition au pesticide, les cellules viables sont plus actives soit parce qu'elles se multiplient de nouveau, colonisant l'espace laissé par les éventuelles cellules mortes dues à l'intoxication, soit parce qu'elles sont davantage actives pour détoxifier le fipronil et/ou ses métabolites.

L'effet pro-oxydant du fipronil n'a pas été observé chez les abeilles non infectées. Cependant, les abeilles infectées et exposées au fipronil ont montré significativement moins d'ERO à partir de 7 jours post-infection, par rapport aux abeilles seulement traitées au fipronil.

145

1.4.3. Quels sont les effets du fipronil seul ou en présence de *N. ceranae* sur l'oxydation des lipides et des protéines ?

Nous avons constaté une augmentation non significative de l'oxydation des protéines chez les abeilles uniquement intoxiquées au fipronil. Cette augmentation est d'autant plus marquée et significative lorsque les abeilles sont intoxiquées au fipronil et infectées par le parasite *N. ceranae*. Or, contrairement à l'oxydation des lipides qui est un phénomène réversible, l'oxydation des protéines est irréversible. De plus, l'oxydation des lipides peut engendrer la formation d'aldéhydes, tel que le malondialdéhyde (MDA) que nous avons mesuré dans notre étude (Paris *et al.*, 2017), mais aussi le 4-hydroxynonanal (4-HNE). Ce dernier a la particularité de se fixer aux protéines sur les résidus tels que la cystéine, lysine et histidine, engendrant une augmentation des protéines carbonylées (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Grimsrud *et al.*, 2008).

En outre, pour éliminer les protéines endommagées, le protéasome de la cellule est mis en jeu afin de recycler les protéines oxydées (Costa *et al.*, 2007). Cependant, ce processus est relativement lent et les protéines oxydées peuvent donc s'accumuler dans la cellule, facilitant ainsi leur quantification.

La carbonylation des protéines est donc un marqueur stable de l'état d'oxydation des cellules puisque (i) les protéines peuvent être la cible des ERO produites, mais aussi la cible des lipides oxydés, et que (ii) les protéines carbonylées ne sont pas labiles par rapport aux autres constituants cellulaires pouvant être oxydés.

La tendance à l'augmentation de l'oxydation des protéines par le fipronil chez les abeilles intoxiquées est probablement due à la métabolisation de ce xénobiotique par les cytochromes P450 réquisitionnées pour le dégrader mais qui sont elles-mêmes oxydées au cours de ce processus (Scharf *et al.*, 2000), mais aussi peut-être plus indirectement *via* une augmentation des lipides oxydés.

De précédentes études ont d'ailleurs montré qu'en culture cellulaire, l'ajout de fipronil augmentait la concentration en MDA de façon significative à 30 et 100 μM dans les cellules neuronales SH-SY5Y (Romero *et al.*, 2016). Or, bien que ce ne soit pas significatif et que ce ne soit pas dans les mêmes concentrations ou conditions physiologiques, nous avons également observé une tendance à l'augmentation des MDA dans l'intestin des abeilles exposées au fipronil. Cependant, n'ayant pas de moyen simple de mesurer la quantité des lipides totaux dans les intestins d'abeilles, j'ai rapporté les mesures uniquement au poids de l'intestin afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux.

Nous avons observé une diminution significative des lipides oxydés chez les abeilles infectées 14 jours après infection, en présence ou non de fipronil. Or, les lipides peroxydés sont détoxiqués par la Glutathion-S-Transférase (GST) (Leaver & George, 1998), et les précédentes études menées sur l'abeille ont montré une augmentation de l'activité de la GST et du niveau d'expression de son gène (Vidau *et al.*, 2011a; Dussaubat *et al.*, 2012, 2016). Il est ainsi probable que la détoxification des lipides soit plus importante lors d'une infection par *N. ceranae*. En présence du fipronil, plusieurs études ne montrent aucune augmentation de l'activité de la GST dans l'intestin (Renzi *et al.*, 2016; Kairo *et al.*, 2017), ce qui pourrait être l'une des raisons de la tendance à l'augmentation des lipides oxydés observée en présence de fipronil comme nous l'avons démontré (Paris *et al.*, 2017).

Pour étayer ces hypothèses, il serait judicieux de s'intéresser davantage aux réserves lipidiques intracellulaires de l'abeille, les gouttelettes lipidiques, ainsi qu'aux réserves lipidiques du corps gras puisque ce dernier est une zone importante de la détoxification des xénobiotiques (cependant principalement administrés par voie topique (Yu *et al.*, 1984)).

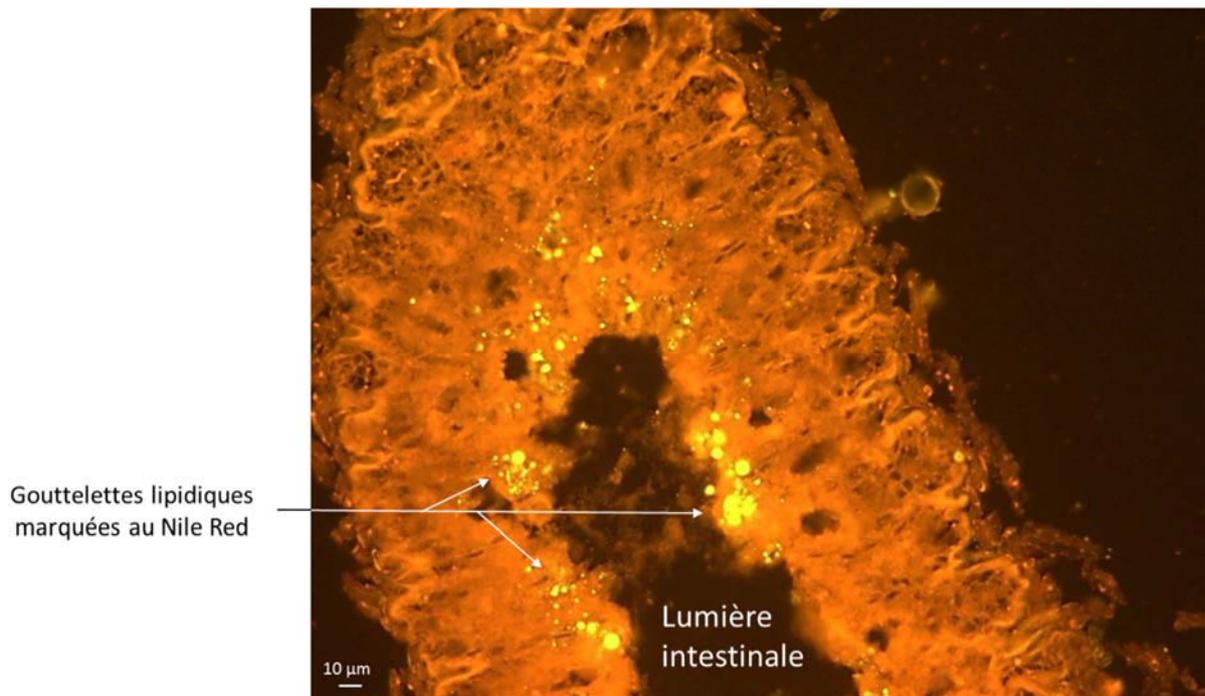


Figure 56. Extrusion lipidique depuis les cellules épithéliales de l'intestin de l'abeille en présence de fipronil. Après 14 jours d'exposition chronique orale au fipronil à 0,5 $\mu\text{g/L}$, l'intestin des abeilles a été disséqué. Les intestins ont ensuite été fixés puis des coupes histologiques ont été réalisées grâce à un cryomicrotome. Les coupes ont été incubées en présence de Nile Red. Ce colorant se fixe sur les triglycérides des gouttelettes lipidiques permettant de les observer en microscopie à épifluorescence à λ_{580} nm (d'après Diogon M., communication personnelle).

2. Les réserves lipidiques, un paramètre important de l'interaction *N. ceranae*/fipronil/abeille ?

Des travaux réalisés chez la drosophile dans le cadre de l'ANR BEELOSS ont montré qu'une intoxication au fipronil par voie orale engendrait une extrusion des lipides dans la lumière intestinale (Franchet, 2015). Or, des études sont en cours au laboratoire sur la quantification des gouttelettes lipidiques (réserves lipidiques de la cellule, essentiellement composées de triglycérides) en culture de cellules infectées ou non par les microsporidies, mais aussi sur le corps gras et l'intestin de l'abeille afin d'évaluer les variations éventuelles de la quantité de ces gouttelettes lipidiques en présence de fipronil et/ou de *N. ceranae*. Les premiers résultats ont montré une augmentation des réserves lipidiques dans les cellules en culture intoxiquées au fipronil.

Des expérimentations menées sur abeilles semblent également montrer une extrusion des lipides dans l'intestin des abeilles intoxiquées dès 7 jours après une exposition orale chronique à 0,5 µg/L de fipronil (Figure 56) (Diogon M., communication personnelle). Cette extrusion lipidique pourrait être le résultat d'une purge des lipides oxydés après intoxication au fipronil.

En présence de *N. ceranae*, une diminution de la quantité des gouttelettes lipidiques contenues dans les cellules de stockage des lipides du corps gras a été observée. Ceci pourrait suggérer que le parasite détourne les réserves lipidiques de l'hôte pour son propre développement. Bien que le cycle de *Nosema* ait lieu uniquement dans l'intestin, le parasite pourrait donc altérer le métabolisme d'autres organes comme le corps gras. Ceci est en accord avec le fait que *Nosema* spp. pouvait induire des modifications délétères dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des sucres dans le corps gras (Holt *et al.*, 2013).

Les études concernant la co-exposition *N. ceranae*/fipronil sont quant à elles encore en cours.

3. Comment *N. ceranae* et le fipronil influencent-ils les communautés microbiennes de l'intestin de l'abeille (Chapitre 4) ?

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet sur le microbiote intestinal de l'abeille de deux insecticides, le fipronil (phénylpyrazole) et le thiaméthoxame (néonicotinoïde), d'un fongicide, le boscalide (carboxamide), et d'un antioxydant, la N-acétylcystéine.

Nous avons analysé la composition du microbiote intestinal des abeilles et de son évolution au cours du temps, lorsque celles-ci sont infectées par *N. ceranae* et/ou exposées aux différentes molécules par des approches de séquençage à haut-débit. Le suivi des communautés bactériennes a été réalisé par séquençage de l'ADNr et de l'ARNr 16S. Les résultats ont montré que le microbiote intestinal semblait davantage affecté après 17 jours de traitement. Ceci pourrait signifier que (i) l'infection n'était pas

assez développée ou que l'intoxication n'était pas assez forte après 10 jours d'exposition pour provoquer une perturbation des communautés bactériennes, et/ou (ii) la perturbation n'est visible et mesurable que lorsque la dysbiose est importante, ce qui ne signifie pas qu'elle n'est pas initiée plus précocement. De plus, il semblerait, aux vues des résultats obtenus que ce soit l'activité plutôt que l'abondance des communautés bactériennes qui ait davantage été modifiée en présence des traitements.

Les modifications du microbiote les plus remarquables concernent une diminution de l'abondance et de l'activité des Alphaprotéobactéries (en particulier l'ordre des Rhizobiales) et une augmentation de celles des Gammaprotéobactéries (particulièrement l'ordre des Orbales) dans les groupes d'abeilles infectées par *N. ceranae*. Cependant, ces variations n'ont été significatives que pour les activités et uniquement dans les groupes d'abeilles co-exposés à *N. ceranae* et aux pesticides ou à l'antioxydant. Or, plusieurs études ont montré que les Rhizobiales joueraient un rôle important dans l'apport d'azote et participeraient au développement de l'hôte et à sa défense contre les agents pathogènes (Russell *et al.*, 2009; Ramírez-Puebla *et al.*, 2013). Les Gammaprotéobactéries sont également connues pour avoir un rôle bénéfique pour l'hôte (apport de vitamines, dégradation des macromolécules végétales...) (Engel *et al.*, 2012; Kwong *et al.*, 2014).

Il semblerait que, contrairement aux Alphaprotéobactéries qui seraient sensibles à la présence de *N. ceranae* (diminution de leur activité d'environ 2,5 fois), et davantage en présence d'un stresser chimique (diminution de l'activité de plus de 3 fois), les Gammaprotéobactéries soient plus actives, (i) soit parce qu'elles profitent d'une niche écologique qui se libère pour se développer, (ii) et/ou soit, parce qu'elles répondent indirectement aux effets de *N. ceranae* et des traitements sur l'abeille (*e.g.* perturbation globale de la fonction digestive modifiant par exemple la digestion des aliments et donc l'apport en molécules utilisables pour le microbiote).

La première hypothèse serait plausible si les abondances en ADN des Alphaprotéobactéries étaient significativement diminuées. Ne l'étant pas, cela peut refléter un ralentissement de leur activité, mais aussi, l'absence d'une dégradation complète de l'ADN des Alphaprotéobactéries mortes, et donc toujours identifiables par séquençage. Il faudrait dans ce cas, effectuer une mesure plus tardive du microbiote et constater l'abondance en ADN des Gammaprotéobactéries : si elle augmentait, alors l'augmentation de l'activité des Gammaprotéobactéries mesurée refléterait une croissance de la population.

Concernant la seconde hypothèse, qui n'est pas en contradiction avec la première, nous n'avons pas constaté de différence dans le comportement global de consommation de sirop des abeilles au cours de l'expérience. Cependant, il est difficile de savoir comment évolue le dialogue microbiote/cellules hôtes, en termes d'absorption des nutriments. S'il est modifié en présence de *Nosema* et des molécules chimiques : est-il perturbé avec une diminution de la quantité de nutriments

alloués aux cellules hôtes, profitant ainsi à la croissance du microbiote ? À l'inverse, les nutriments profitent-ils davantage à l'hôte ? Le microbiote sensible mort serait-il recyclé par le microbiote non sensible survivant ? *Nosema* et les molécules testées ont-ils une influence directe sur la composition du microbiote ?

Bien des questions auxquelles le séquençage seul ne suffit pas à apporter les réponses. Il est donc nécessaire de coupler ces données à des données de métabolomiques par exemple, pour mieux comprendre les voies métaboliques mises en jeu dans ce dialogue abeille/pesticides/*Nosema*/microbiote.

Des études ont montré que la présence de *N. ceranae* engendrait une diminution de l'apoptose des cellules intestinales (Higes *et al.*, 2013a; Kurze *et al.*, 2015). Cette diminution de l'apoptose pourrait être néfaste pour le renouvellement des cellules intestinales. Des travaux menés au laboratoire ont d'ailleurs montré une diminution de la quantité de cellules épithéliales intestinales en division grâce à un marquage à la bromodésoxyuridine (BrdU), un nucléoside synthétique analogue de la thymidine qui s'intercale dans l'ADN des cellules en cours de réplication. Le BrdU a été administré en continu par voie orale aux abeilles et les mesures réalisées sur des coupes histologiques de l'intestin ont révélé une diminution du renouvellement cellulaire dans l'intestin des abeilles infectées par *N. ceranae* (Panek J., communication personnelle). Cette perturbation du renouvellement cellulaire pourrait à terme engendrer des perturbations dans la fonction digestive, modifiant la disponibilité en nutriments pour le microbiote, et pouvant participer à la dysbiose.

Au cours de cette étude portant sur le microbiote intestinal de l'abeille, j'ai également réalisé en parallèle des analyses de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) sur les ADN extraits des échantillons. Cette technique consiste à séparer les brins d'ADN le long d'un gradient dénaturant. Les deux brins d'ADN se séparent alors plus ou moins rapidement en fonction de leur pourcentage en bases AT et CG. Grâce au programme d'analyse Gel ComparII (Applied Maths), il est possible de discriminer les différences entre les traitements grâce à la méthode de groupement UPGMA. Cependant, la trop grande variabilité entre les échantillons d'une même condition rend difficile l'affiliation des différentes conditions les unes par rapport aux autres. Cette expérimentation m'a cependant permis de me familiariser avec une méthode d'analyse peu coûteuse, bien que moins précise que le séquençage. En effet, une bande observée sur le gel peut correspondre à deux espèces différentes dont la séquence d'ADN amplifiée à la même composition en AT et CG, tout en étant singulièrement différente. De plus, il est difficile de détecter les communautés bactériennes minoritaires par cette technique.

Le séquençage reste donc la méthode la plus efficace, bien qu'il soit nécessaire d'analyser l'ARN en parallèle de l'ADN pour ne pas avoir une idée faussée de l'abondance des communautés. Cependant, le séquençage ne nous a pas permis d'identifier les perturbations à l'échelle des espèces (l'identification n'allant parfois pas plus loin que la classe). À terme, l'équipe envisage de collaborer avec un autre laboratoire (CIDAM, Clermont-Ferrand) et d'utiliser une technique de capture de gènes pour aller plus loin dans l'affiliation des OTUs. Cette technique consiste à hybrider de grands fragments d'ADN avec des sondes biotinyllées, les amplifier puis les séquencer. Cela permettra ainsi d'accéder à des gènes ne pouvant être caractérisés par des approches directes de séquençage massif, et d'affilier ces gènes à une espèce.

3.1. Y a-t-il un lien entre dysbiose intestinale et stress oxydant chez l'abeille ?

Les études menées sur le fonctionnement de DUOX dans l'immunité intestinale de l'insecte montrent qu'il existe un lien étroit entre la cellule hôte et le microbiote par l'intermédiaire des ERO (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Ferrandon, 2013; Kim & Lee, 2014; Lee *et al.*, 2015b). Dans ce contexte, les ERO produites participent au maintien de l'intégrité des communautés microbiennes intestinales commensales et aident à lutter contre les invasions induites par des bactéries pathogènes, ou à contrôler le développement de pathobiontes.

Une récente étude portant sur la bactérie commensale de l'iléon de l'abeille, *Snodgrassella alvi*, a montré que trois grandes catégories de ses gènes participaient à l'amélioration de la colonisation, avec notamment des gènes impliqués dans les interactions avec les cellules de l'hôte ou d'autres bactéries du microbiote, des métabolismes intracellulaires (utilisation du carbone, biosynthèse d'acides aminés...) et des réponses au stress (disponibilité des nutriments, pH, température fluctuante...). Ils ont ainsi identifié des gènes codant pour la formation de glutathion, mais aussi des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Powell *et al.*, 2016), suggérant une capacité des bactéries commensales de se défendre des ERO, à l'instar des cellules intestinales de l'abeille, par exemple lors de la production d'ERO induite en réponse à une infection.

En présence de *N. ceranae*, partant de l'hypothèse que la génération d'un stress oxydant soit interne à la cellule hôte, cette perturbation de la balance oxydante ne devrait pas affecter directement la flore intestinale. Les perturbations du microbiote constatées lors de notre étude liées à la présence de *Nosema* pourraient être la conséquence d'une perturbation de l'ensemble de l'environnement de l'intestin (changement de pH, altération de la membrane péritrophique, malabsorption de nutriments). L'ajout de molécules telles que les pesticides pourrait également impacter l'environnement intestinal mais aussi, plus directement le microbiote. La perturbation de la balance oxydante intracellulaire ne semble donc pas avoir un impact direct sur les communautés bactériennes de l'intestin de l'abeille.

À ce jour, nous n'avons pas encore analysé les séquences d'ADNr et ARNr 18S de nos échantillons, rendant compte de la communauté fongique du microbiote intestinal de l'abeille. Ces données nous permettront de voir si, dans nos différentes conditions expérimentales, l'abondance et l'activité des communautés fongiques sont modifiées. Une récente étude a cependant montré que la présence de pesticides n'induisait pas de modification de l'abondance des communautés fongiques dans l'intestin des abeilles (Kakumanu *et al.*, 2016).

4. Perspectives

4.1. Améliorer les outils pour les études *in vitro*

Pour mieux comprendre l'effet de *N. ceranae* et/ou des pesticides sur les abeilles, il serait intéressant pour le laboratoire de développer leur propre culture de cellules d'abeille, afin d'élargir les champs du possible pour les études *in vitro*. En attendant, utiliser des souches cellulaires plus proches du modèle abeille, voire du modèle intestinal des insectes est à envisager pour l'avenir. De même, il faudrait parvenir à mettre en culture l'espèce *N. ceranae*. Aussi, l'utilisation d'une espèce microsporidienne proche de celle de *Nosema*, telle qu'*Anncaliia algerae*, ou *Tubulinosema ratisbonensis* (une microsporidie parasite de la drosophile) reste à exploiter. Ces deux espèces sont en effet facilement cultivées *in vitro* dans différents types cellulaires. Il serait donc intéressant d'effectuer des mesures de stress oxydant et des réserves lipidiques sur des cultures d'insectes infectées par l'une ou l'autre de ces espèces.

Aussi, dans le cadre de l'interaction microsporidies/fipronil, il serait intéressant de tester l'infection des microsporidies sur des lignées cellulaires utilisées lors des études de toxicologie telles que des cellules neuronales. Plusieurs études où l'effet du fipronil a été évalué *in vitro* ont utilisé la lignée neuronale humaine SH-SY5Y (Vidau *et al.*, 2011b; Ki *et al.*, 2012; Romero *et al.*, 2016), ce qui permettrait d'observer l'effet neurotoxique du pesticide dans cette interaction.

Enfin, il serait possible, à défaut de ne pas disposer de cellules intestinales d'insectes, d'utiliser des cellules intestinales humaines. J'ai pour ma part testé différentes souches disponibles au laboratoire. La première difficulté était de mettre en place les conditions d'infection de ces cellules par *E. cuniculi*. L'infection s'est en effet propagée dans les lignées HT29 et i407, mais les types cellulaires tels que Caco-2 et HCT116 n'ont pas permis un très bon développement du parasite et une faible production de spores a été obtenue.

4.2. L'ARN interférent, une solution pour l'étude des voies métaboliques chez l'abeille

N'ayant pas de mutants disponibles chez l'abeille, aux vues de son mode de reproduction, pour étudier les différentes voies métaboliques et les gènes impliqués, une solution alternative possible serait l'utilisation d'ARN interférents (ARNi). Les ARNi sont des acides ribonucléiques simple ou double brins, administrés aux abeilles par injection sous la cuticule ou *per os*, dans le but d'interférer avec les ARN messagers cibles et d'empêcher leur traduction. Cette technique a déjà été utilisée chez l'abeille dans le but de comprendre le rôle de la vitellogénine dans la maturation des abeilles et dans les réserves énergétiques (Nelson *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2013), d'identifier les voies de régulations des peptides antimicrobiens (Schlüns & Crozier, 2007), ou de cibler les voies activées lors d'infections virales (Hunter *et al.*, 2010; Brutscher *et al.*, 2015).

Pour aller plus loin dans les interactions *N. ceranae*/fipronil/abeilles, il serait intéressant de cibler des ARN messagers des gènes codants pour des enzymes antioxydantes (GST, catalase, SOD), mais aussi des systèmes de détoxification (cytochrome P450), et confirmer ou non définitivement l'absence de réponse immunitaire intestinale en ciblant le gène *duox*.

Dans le cadre d'une infection à *N. ceranae*, une étude a été menée en inhibant les transcrits d'un gène impliqué dans l'inhibition des défenses immunitaires de l'abeille (*i.e.* *nkd*, *naked cuticle*). Les chercheurs ont alors observé une augmentation de l'expression de gènes codant pour les PAM de l'abeille, une diminution de la charge sporale et un rallongement de la durée de vie des abeilles (Wenfeng *et al.*, 2016), montrant ainsi que le parasite peut moduler les gènes de son hôte pour se développer en abaissant ses défenses immunitaires. Huang et collaborateurs ont émis l'hypothèse selon laquelle *N. ceranae* pourrait inhiber l'expression des gènes de l'abeille *via* des micro-ARNs régulateurs sécrétés dans le cytoplasme de la cellule hôte (Huang *et al.*, 2015b). En effet, l'analyse du génome de *N. ceranae* a montré que la microsporidie serait capable de synthétiser ce type d'ARN (Cornman *et al.*, 2009).

L'utilisation d'ARNi pourrait, en plus de permettre la compréhension plus précise de la relation hôte/pathogène, être envisagée comme une solution thérapeutique. En effet, il a été développé une méthode pour lutter contre le virus IAPV de l'abeille en utilisant des ARNi ciblant l'ADN viral (Hunter *et al.*, 2010). De la même façon, certains gènes de *N. ceranae* pourraient être ciblés pour lutter contre le développement de la microsporidie, comme par exemple des gènes codant pour les protéines impliquées dans le processus d'invasion (protéines du tube polaire ou de la paroi), ceux codant pour les transporteurs à nucléotides NTTs (*Nucleotide Transporters*), ou les gènes codant pour les petits ARN régulateurs. En effet, une étude menée par Paldi et collaborateurs a montré que la technique d'ARNi était susceptible de fonctionner sur *N. ceranae*. En effet, les auteurs ont ciblé les gènes codant les transporteurs ATP/ADP de *N. ceranae* ce qui a permis de diviser par 3 la charge sporale (Paldi *et al.*, 2010).

5. Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les perturbations engendrées au niveau intestinal chez l'abeille *Apis mellifera* suite à une infection par le parasite *Nosema ceranae* et/ou une exposition chronique à de faibles doses de l'insecticide fipronil. Nous avons ainsi pu constater que l'impact du parasite semblait souvent plus important que celui du pesticide (production d'ERO, modification de l'activité du microbiote intestinal). Cependant, dans certains cas, la combinaison de ces deux facteurs de stress générait davantage de perturbations physiologiques chez l'abeille, comme par exemple une augmentation de la quantité de protéines oxydées. Le stress oxydant, dans ce contexte d'interaction hôte/parasite, semble être un élément clé de ce dialogue. De même, le microbiote intestinal semble jouer un rôle important dans l'interaction *N. ceranae*/abeille/fipronil.

Ainsi, l'étude et le suivi de ces deux paramètres paraissent essentiels pour mieux comprendre l'affaiblissement des colonies qui sont constamment co-exposées à de multiples facteurs de stress biotiques et abiotiques. Ils pourraient être des pistes à explorer pour, à terme, protéger et améliorer la santé des abeilles.

Références bibliographiques

Sommaire des références bibliographiques

Abu-Akkada	156
Antúnez	157
Basualdo	158
Botías	159
Chaimanee	160
Colin	161
Corradi	162
Decourtye	163
Dussaubat	164
Ferrandon	165
García-palencia	166
Haag	167
Higes	168
Hunter	169
Kawahara	170
Kurze	171
Lü	172
Michaud	173
Nell	174
Pasquale	175
Pombert	176
Raovet	177
Roussel	178
Simeunovic	179
Thélohan	180
Vidau	181
Williams	182
Zee	183

Abu-Akkada

Abu-Akkada, S.S. & Oda, S.S. (2016) Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed rabbits with fenbendazole. *Iranian Journal of Veterinary Research*, **17**, 98–105.

Afssa & Afsse. (2005) *Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil - Synthèse et conclusion du rapport du groupe de travail : L' exposition au fipronil pourrait-elle entraîner un risque pour l' homme ?*

Ahn, J.-H., Hong, I.-P., Bok, J.-I., Kim, B.-Y., Song, J. & Weon, H.-Y. (2012) Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, **50**, 735–745.

Akiyoshi, D.E., Morrison, H.G., Lei, S., Feng, X., Zhang, Q., Corradi, N., *et al.* (2009) Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000261.

Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., *et al.* (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, **12**, 774–82.

Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., *et al.* (2011) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, **106**, 380–5.

Aliferis, K. a, Copley, T. & Jabaji, S. (2012) Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *Journal of insect physiology*, **58**, 1349–59.

Aliouane, Y., Hassani, A.K. El, 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**, 113–122.

Andreadis, T.G. & Vossbrinck, C.R. (2002) Life Cycle, infrastructure and Molecular Phylogeny of *Hyalinocysta chapmani* (Microsporidia+Thelohaniidae), a parasite of *Culiseta melanura* (Diptera+Culicidae) and *Orthocyclops modestus* (Copepoda+Cyclopidae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **49**, 350–364.

ANSES. (2015) *Co-exposition des abeilles aux facteurs de stress Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective.*

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**, 2284–90.

Antúnez

Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E. & Invernizzi, C. (2013) Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 227–234.

Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N. & Bernardinelli, I. (2008) *Virology and the Honey Bee*. European C. European Research Area, Belgium.

Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., *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. *PloS one*, **9**, e91686.

Avenot, H.F. & Michailides, T.J. (2007) Resistance to Boscalid Fungicide in *Alternaria alternata* Isolates from Pistachio in California. *The American Phytopathological Society*, **91**, 13451350.

Aydin, L., Gulegen, E., Cakmak, I., Girisgin, A.O. & Wells, H. (2006) Relation between *Nosema* and chalkbrood diseases, and its implication for an apiary management model. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **50**, 471–475.

Ayer, A., Gourlay, C.W. & Dawes, I.W. (2013) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **14**, 60–72.

Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., *et al.* (2017) RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *Plos One*, **12**, e0173438.

Baer, B., Peng, Y., Grassl, J. & Harvey Millar, A. (2016) Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proceedings Biological Science*, **283**, 20151785.

Bakowski, M.A., Priest, M., Young, S., Cuomo, C.A. & Troemel, E.R. (2014) Genome Sequence of the Microsporidian Species *Nematocida* sp1 Strain ERTm6 (ATCC PRA-372). *Genome announcements*, **2**, e00905-14.

Balbani, G. (1882) Sur les microsporidies ou sporospermies des articules. *Comptes Rendus de l'Association des Sciences*, **95**, 1168–1171.

Baneux, P.J.R. & Pognan, F. (2003) In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals*, **37**, 132–138.

Barbut, F. & Joly, F. (2010) Le microbiote intestinal : équilibre et dysbiose. *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive*, **17**, 511–520.

Barouki, R. (2006) Stress oxydant et vieillissement. *MEDECINE/SCIENCES*, **22**, 266–272.

Basualdo

Basualdo, M., Barragán, S. & Antúnez, K. (2014) Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, **6**, 396–400.

Batty, E., Jensen, K. & Freemont, P. (2009) PML nuclear bodies and their spatial relationships in the mammalian cell nucleus. *Frontiers in bioscience Landmark edition*, **14**, 1182–96.

Beaurin, D. (2006) *Thèse : Séroprévalence d'Encephalitozoon cuniculi chez le lapin de compagnie en Région Parisienne.*

Becattini, S., Taur, Y. & Pamer, E.G. (2016) Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine*, **22**, 458–478.

Belzunces, L.P., Tchamitchian, S. & Brunet, J.L. (2012) Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, **43**, 348–370.

Benz, P., Maaß, G., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Tichy, A., *et al.* (2011) Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Veterinary Ophthalmology*, **14**, 37–47.

Berenbaum, M.R. & Johnson, R.M. (2015) Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 51–58.

Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J.C. & Gauthier, M. (2009) Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *Journal of Insect Physiology*, **55**, 1099–1106.

Bevilacqua, E., Gomes, S.Z., Lorenzon, A.R., Hoshida, M.S. & Amarante-Paffaro, A.M. (2012) NADPH oxidase as an important source of reactive oxygen species at the mouse maternal-fetal interface: putative biological roles. *Reproductive BioMedicine Online*, **25**, 31–43.

Beznoussenko, G. V., Dolgikh, V. V., Seliverstova, E. V., Semenov, P.B., Tokarev, Y.S., Trucco, A., *et al.* (2007) Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science*, **120**, 1288–1298.

Bienert, gerd P., Schjoerring, J.K. & Jahn, T.P. (2006) Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1758**, 994–1003.

Bienert, G.P. & Chaumont, F. (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1840**, 1596–1604.

Bolognesi, R., Terra, W.R. & Ferreira, C. (2008) Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency. Theoretical and experimental models. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 1413–1422.

Bonmatin, J.M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., *et al.* (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 35–67.

Botías

Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., *et al.* (2012) *Nosema spp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies). *Environmental Microbiology Reports*, **4**, 57–65.

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 leve. *Veterinary Research*, **44**, 25–38.

Branchiccela, B., Arredondo, D., Higes, & M., Invernizzi, C., Martín-Hernández, R., Tomasco, I., *et al.* (2017) Characterization of *Nosema ceranae* Genetic Variants from Different Geographic Origins. *Microbial Ecology*, **73**, 978–987.

Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., *et al.* (2010) Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS One*, **5**, e13181.

Brutscher, L.M., Daughenbaugh, K.F. & Flenniken, M.L. (2015) Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 71–82.

Cadenas, E. & Davies, K.J. a. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging11This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radical Biology and Medicine*, **29**, 222–230.

Cali, A. & Takvorian, P.M. (2014) Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (ed. by Weiss, L.M. & Becnel, J.J.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 71–134.

Campbell, S.E., Williams, T.A., Yousuf, A., Soanes, D.M., Paszkiewicz, K.H. & Williams, B.A.P. (2013) The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions. *PLoS Genetics*, **9**, e1003676.

Carson, R. (1962) *Synthèse détaillée de Printemps silencieux*.

Carvalho, S.M., Belzunces, L.P., Carvalho, G. a, Brunet, J.-L. & Badiou-Beneteau, A. (2013) Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, **32**, 2117–24.

Casida, J.E. & Durkin, K.A. (2012) Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology*, **58**, 99–117.

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D. & Pettis, J.S. (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of insect physiology*, **58**, 1090–5.

Chaimanee

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D. & Pettis, J.S. (2014) Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, **45**, 451–463.

Chaimanee, V., Pettis, J.S., Chen, Y., Evans, J.D., Khongphinitbunjong, K. & Chantawannakul, P. (2013) Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Veterinary Parasitology*, **193**, 260–265.

Charbonneau, L.R., Hillier, N.K., Rogers, R.E.L., Williams, G.R. & Shutler, D. (2016) Effects of *Nosema apis*, *N. ceranae*, and coinfections on honey bee (*Apis mellifera*) learning and memory. *Scientific reports*, **6**, 22626.

Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., *et al.* (2009) Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in France. *Environmental Entomology*, **38**, 514–523.

Chauzat, P., Laurent, M., Pierre, M., Hendriks, P. & Ribiere-chabert, M. (2014) *Epilobee : A pan-European epidemiological pidemiological study on honeybee honey bee colony losses*.

Chemurot, M., Smet, L. De, Brunain, M., Rycke, R. De & Graaf, D.C. de. (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, J.D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-rindal, D., *et al.* (2009a) Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **56**, 142–147.

Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., *et al.* (2009b) Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, **101**, 204–9.

Chen, Y. ping, Pettis, J.S., Zhao, Y., Liu, X., Tallon, L.J., Sadzewicz, L.D., *et al.* (2013) Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC genomics*, **14**, 1–16.

Claudianos, C., Ranson, H., Johnson, R.M., Biswas, S., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., *et al.* (2006) A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, **15**, 615–636.

Clément, H., Conte, Y. Le, Barbançon, J.-M., Vaissière, B., Bonnaffé, P., Reeb, C., *et al.* (2013) *Le traité rustica de l'Apiculture*. rustica éd.

Colin

Colin, M.E., Bonmatin, J.M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S. & Vermandere, J.P. (2004) Environmental Contamination and TA 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*, **395**, 387–395.

Commission européenne. (2010) *Règlement (UE) N° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. Journal officiel de l'Union européenne.*

Commission européenne. (2013) *Règlement d'exécution (UE) n° 485/2013 de la Commission du 24 mai 2013 relative aux conditions d'approbation des substances actives clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride et interdisant l'utilisation et la vente de semences traitées avec des produits. Journal officiel de l'Union européenne.*

Connelly, P. (2001) *Environmental Fate of Fipronil.*

Copley, T.R. & Jabaji, S.H. (2012) Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees. *Journal of Applied Microbiology*, **112**, 15–24.

Corby-Harris, V., Maes, P. & Anderson, K.E. (2014) The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS one*, **9**, e95056.

Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C.A.D., Naldo, R., Mott, B. & Anderson, K.E. (2016) *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *Apiculture and Social Insects*, **109**, 537-.

Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., et al. (2009) Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000466.

Corona, M. & Robinson, G.E. (2006) Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect molecular biology*, **15**, 687–701.

Corradi, N. (2015) Microsporidia: Eukaryotic Intracellular Parasites Shaped by Gene Loss and Horizontal Gene Transfers. *Annual Review of Microbiology*, **69**, 167–183.

Corradi, N., Akiyoshi, D.E., Morrison, H.G., Feng, X., Weiss, L.M., Tzipori, S., et al. (2007) Patterns of genome evolution among the microsporidian parasites *Encephalitozoon cuniculi*, *Antonosporea locustae* and *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS one*, **2**, e1277.

Corradi, N., Haag, K.L., Pombert, J.-F., Ebert, D. & Keeling, P.J. (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**.

Corradi

Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E.S. & Keeling, P.J. (2010) The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature communications*, **1**, 1–7.

Costa, C., Lodesani, M. & Maistrello, L. (2010) Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions*. *Apidologie*, **41**, 141–150.

Costa, V., Quintanilha, A. & Moradas-Ferreira, P. (2007) Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB Life*, **59**, 293–298.

Cousin, M., Silva-Zacarin, E., Kretzschmar, A., Maataoui, M. El, Brunet, J.-L. & Belzunces, L.P. (2013) Size changes in honey bee larvae oenocytes induced by exposure to Paraquat at very low concentrations. *PloS one*, **8**, e65693.

Cox-foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N. a, *et al.* (2007) A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, **318**, 283–287.

Cremer, S., Armitage, S.A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007) Social Immunity. *Current Biology*, **17**, R693–R702.

Cuomo, C.A., Becnel, J.J., Sanscrainte, N.D., Walker, B., Young, S. & Zeng, Q. (n.d.) The Genome Sequence of *Anncaliia algerae* insect isolate PRA339. *NCBI*.

Cuomo, C.A., Becnel, J.J., Sanscrainte, N.D., Young, S. & Zeng, Q. (n.d.) The Genome Sequence of *Vavraia culicis* strain *floridensis*. *NCBI*, **Unpublishe**.

Cuomo, C.A., Desjardins, C.A., Bakowski, M.A., Goldberg, J., Ma, A.T., Becnel, J.J., *et al.* (2012) Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *genome Research*, **22**, 2478–2488.

Cuomo, C.A., Didier, E.S., Bowers, L., Young, S. & Zeng, Q. (n.d.) The Genome Sequence of *Vittaforma corneae* strain ATCC 50505. *NCBI*.

Cuomo, C.A., Weiss, L.M., Walker, B., Young, S. & Zeng, Q. (n.d.) The Genome Sequence of *Anncaliia algerae* human isolate PRA109. *NCBI*.

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **10**, 389–406.

Decourtye, A. & Devillers, J. (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors* (ed. by Steeve Herve Thany). Advances in Experimental Medicine and Biology, New York, pp. 85–95.

Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P. & Gauthier, M. (2011) Honeybee tracking with microchips : a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*, **20**, 429–437.

Decourtye

Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Menach, K. Le, Budzinski, H., Cluzeau, S., *et al.* (2005) Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, **250**, 242–250.

Degrandi-Hoffman, G., Corby-Harris, V., Watkins Dejong, E., Chambers, M. & Hidalgo, G. (2017) Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. *Apidologie*, **48**, 340–352.

Delattre, J., Beaudoux, J.-L. & Bonnefont-Rousselot, D. (2005) *Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques*. Tec & Doc Lavoisier.

Delbac, F., Peuvél, I., Metenier, G., Peyretailade, E. & Vivares, C.P. (2001) Microsporidian invasion apparatus: Identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three *Encephalitozoon* species. *Infection and Immunity*, **69**, 1016–1024.

Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A. & Vivarès, C.P. (1998) On proteins of the microsporidian invasive apparatus: Complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular Microbiology*, **29**, 825–834.

Desjardins, C.A., Sanscrainte, N.D., Goldberg, J.M., Heiman, D., Young, S., Zeng, Q., *et al.* (2015) Contrasting host–pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. *Nature Communications*, **6**, 1–12.

Doré, J. & Corthier, G. (2010) Le microbiote intestinal humain. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **34**, 7–16.

Doublet, V., Labarussias, M., Miranda, J.R. de, Moritz, R.F.A. & Paxton, R.J. (2014) Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*, **17**, 969–983.

Doublet, V., Natsopoulou, M.E., Zschiesche, L. & Paxton, R.J. (2015) Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, **124**, 31–34.

Dubuffet, A., Smith, J.E., Solter, L., Perotti, M.A., Braig, H.R. & Dunn, A.M. (2013) Specific Detection and Localization of Microsporidian Parasites in Invertebrate Hosts by Using In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 385–388.

Dunn, A.M. & Smith, J.E. (2001) Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection*, **3**, 381–388.

Dupré-Crochet, S., Erard, M. & Nüße, O. (2013) ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of leukocyte biology*, **94**, 657–70.

Dussaubat, C. (2012) *Thèse : Effets de Nosema ceranae (Microsporidia) sur la santé de l'abeille domestique Apis mellifera L.*

Dussaubat

Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., *et al.* (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS one*, **7**, e37017.

Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.-L., Plettner, E., *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., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., *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., Maisonnasse, A., Crauser, D. & Tchamitchian, S. (2016) Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific Reports*, 1–7.

Dussaubat, C., Sagastume, S., Gómez-Moracho, T., Botías, C., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., *et al.* (2013b) Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. *Veterinary Microbiology*, **162**, 670–678.

Engel, P., James, R.R., Koga, R., Kwong, W.K., McFrederick, Q.S. & Moran, N.A. (2013) Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, **52**.

Engel, P., Kwong, W.K., McFrederick, Q., Anderson, K.E., Barribeau, S.M., Chandler, J.A., *et al.* (2016) The bee microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. *mBio*, **7**, e02164-15.

Engel, P., Martinson, V.G. & Moran, N.A. (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 11002–7.

Engel, P. & Moran, N.A. (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 699–735.

Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., *et al.* (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, **6**, 71–9.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., *et al.* (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, **15**, 645–56.

Evans, J.D. & Spivak, M. (2010) Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S62–S72.

FAO. (2017) *Food and Agriculture Organization of the United - FAOSTAT - faostat.fao.org*.

Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R. & Aguila, C. del. (2009) High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Applied and environmental microbiology*, **75**, 6886–9.

Ferrandon

Ferrandon, D. (2013) The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster* : from resistance to resilience. *Current opinion in immunology*, **25**, 59–70.

Filomeni, G., Zio, D. De & Cecconi, F. (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, **22**, 377–388.

Fleming, J.C., Schmehl, D.R. & Ellis, J.D. (2015) Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema spp.* in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE*, **10**, 1–14.

Fond, G., Chevalier, G., Eberl, G. & Leboyer, M. (2016) Le rôle potentiel du microbiote intestinal dans les troubles psychiatriques majeurs : mécanismes, données fondamentales, comorbidités gastro-intestinales et options thérapeutiques. *La Presse Médicale*, **45**, 7–19.

Fontbonne, R., Garnery, L., Vidau, C., Aufauvre, J., Texier, C., Tchamitchian, S., *et al.* (2013) Comparative susceptibility of three Western honeybee taxa to the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Infection, Genetics and Evolution*, **17**, 188–94.

Forsgren, E. & Fries, I. (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology*, **170**, 212–217.

Franchet, A. (2015) *Thesis : Study of Drosophila melanogaster infection by the microsporidia Tubulinoosema ratisbonensis: importance of host lipid metabolism for the parasitic proliferation.*

165

Freibert, S.-A., Goldberg, A. V., Hacker, C., Molik, S., Dean, P., Williams, T.A., *et al.* (2017) Evolutionary conservation and in vitro reconstitution of microsporidian iron–sulfur cluster biosynthesis. *Nature Communications*, **8**, 13932.

Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**, S73–S79.

Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., *et al.* (2013) Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–28.

Fries, I., Feng, F., Silva, A. da, Slemenda, S.B. & Pieniazek, N.J. (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (*Microspora*, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (*Hymenoptera*, *Apidae*). *European Journal of Protistology*, **32**, 356–365.

Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P. & Higes, M. (2006) Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, **45**, 230–233.

Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J. & Vaissière, B.E. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, **68**, 810–821.

García-palencia

García-palencia, P., Martín-hernández, R., Marin, P., Meana, A. & Higes, M. (2010) Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, **49**, 278–283.

Genersch, E., Gisder, S., Hedtke, K., Hunter, W.B., Möcke, N. & Müller, U. (2013) Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–8.

Gibbons, D., Morrissey, C. & Mineau, P. (2015) A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 103–118.

Gisder, S. & Genersch, E. (2015) Identification of Candidate Agents Active against *N. ceranae* Infection in Honey Bees: Establishment of a Medium Throughput Screening Assay Based on *N. ceranae* Infected Cultured Cells. *Plos One*, **10**, e0117200.

Gisder, S., Möckel, N., Linde, A. & Genersch, E. (2011) A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology*, **13**, 404–413.

Goblirsch, M., Huang, Z.Y. & Spivak, M. (2013a) Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. *PloS one*, **8**, e58165.

Goblirsch, M.J., Spivak, M.S. & Kurtti, T.J. (2013b) A Cell Line Resource Derived from Honey Bee (*Apis mellifera*) Embryonic Tissues. *PLoS One*, **8**, e69831.

Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., *et al.* (2008) Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature*, **452**, 624–628.

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. & Rotheray, E.L. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, **347**, 1255957.

Gregorc, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Carvalho, S.M., Kramberger, D., Teixeira, E.W. & 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.

Gregorc, a & Bowen, I.D. (1998) Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell biology international*, **22**, 137–44.

Grimsrud, P. a, Xie, H., Griffin, T.J. & Bernlohr, D. a. (2008) Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 21837–41.

Guichard, C., Moreau, R., Pessayre, D., Epperson, T.K. & Krause, K.-H. (2008) NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochemical Society transactions*, **36**, 920–929.

Haag

Haag, K.L., James, T.Y., Pombert, J.-F., Larsson, R., Schaer, T.M.M., Refardt, D., *et al.* (2014) Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 15480–15485.

Hainzl, D., Cole, L.M. & Casida, J.E. (1998) Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct. *Chemical Research in Toxicology*, **11**, 1529–1535.

Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., *et al.* (2011) Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology*, **135**, 524–533.

Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P.M., Cali, A., *et al.* (2017) The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathogens*, **13**, e1006341.

Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., *et al.* (2013) Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 28369–81.

Heinz, E., Williams, T.A., Nakjang, S., Noël, C.J., Swan, D.C., Goldberg, A. V., *et al.* (2012) The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLoS Pathogens*, **8**, e1002979.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., *et al.* (2012) A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, **336**, 348–350.

167

Henry, M., Bertrand, C., Féon, V. Le, Requier, F., Odoux, J.-F., Aupinel, P., *et al.* (2014) Pesticide risk assessment in free-ranging bees is weather and landscape dependent. *Nature Communications*, **5**, 4359.

Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayraud, M., Odoux, J.-F., *et al.* (2015) Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **282**, 20152110.

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**, 211–7.

Higes, M., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., *et al.* (2013a) Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: *Nosematidae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology reports*, **5**, 530–6.

Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A. V., Barrios, L., *et al.* (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, **10**, 2659–2669.

Higes

- Higes, M., Martín-Hernández, R., García-Palencia, P., Marín, P. & Meana, A. (2009) Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology reports*, **1**, 495–8.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R. & Meana, A. (2010) Review article *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, **41**, 375–392.
- Higes, M., Martín, R. & Meana, A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, **92**, 93–5.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. & Martín-Hernández, R. (2013b) *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 17–29.
- Higes, M., Rodríguez-García, C., Gómez-Moracho, T., Meana, A., Bartolomé, C., Maside, X., et al. (2016) Short communication: Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **14**, 5–2.
- Hjort, K., Goldberg, A. V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P. & Embley, T.M. (2010) Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **365**, 713–727.
- Holt, H.L., Aronstein, K. a & Grozinger, C.M. (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.
- Horton, M.A., Oliver, R. & Newton, I.L. (2015) No apparent correlation between honey bee forager gut microbiota and honey production. *PeerJ*, **3**, e1329.
- Hrycay, E.G. & Bandiera, S.M. (2015) Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **851**, 1–61.
- Huang, J.-H., Jing, X. & Douglas, A.E. (2015a) The multi-tasking gut epithelium of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **67**, 15–20.
- Huang, Q., Chen, Y., Wang, R.W., Schwarz, R.S. & Evans, J.D. (2015b) Honey bee microRNAs respond to infection by the microsporidian parasite *Nosema ceranae*. *Scientific Reports*, **5**, 17494.
- Huang, Q., Kryger, P., Conte, Y. Le & Moritz, R.F. a. (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.

Hunter

Hunter, W., Ellis, J., VanEngelsdorp, D., Hayes, J., Westervelt, D., Glick, E., *et al.* (2010) Large-Scale Field Application of RNAi Technology Reducing Israeli Acute Paralysis Virus Disease in Honey Bees (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae). *PLoS Pathogens*, **6**, e1001160.

Hunter, W.B. (2010) Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **46**, 83–86.

ITSAP, I. de l'Abeille. (2014) *Guides des bonnes pratiques apicoles*.

Jabot, C., Daniele, G., Giroud, B., Tchamitchian, S., Belzunces, L.P., Casabianca, H., *et al.* (2016) Detection and quantification of boscalid and its metabolites in honeybees. *Chemosphere*, **156**, 245–251.

Jack, C.J., Uppala, S.S., Lucas, H.M. & Sagili, R.R. (2016) Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology*, **87**, 12–19.

James, E.R. & Green, D.R. (2002) Infection and the origins of apoptosis. *Cell death and differentiation*, **9**, 355–7.

Ju, H. & Ghil, S. (2015) Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, **51**, 890–893.

Kairo, G., Biron, D.G., Abdelkader, F. Ben, Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M., *et al.* (2017) *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Scientific Reports*, **7**, 1–14.

Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Abdelkader, F. Ben, Bonnet, M., Cousin, M., *et al.* (2016) Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific Reports*, **6**, 31904–31916.

Kakumanu, M.L., Reeves, A.M., Anderson, T.D., Rodrigues, R.R. & Williams, M. a. (2016) Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Frontiers in Microbiology*, **7**, 3389–1255.

Kamada, N., Chen, G.Y. & Núñez, G. (2013) Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota Structural composition of the gut microbiota. *Nature Immunology*, **14**, 685–690.

Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P. & Machera, K. (2014) Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *The Science of the total environment*, **485–486**, 633–42.

Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., *et al.* (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, **414**, 450–453.

Katznelson, H. & Jamieson, C.E. (1952) Control of *Nosema* disease of honeybees with fumagillin. *Science*, **115**, 70–71.

Kawahara

Kawahara, T., Quinn, M.T. & Lambeth, J.D. (2007) Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC evolutionary biology*, **7**, 109.

Keeling, P., Kunji, E., Goldberg, A., Lucocq, J. & Hirt, R. (2009) Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000489.

Keeling, P.J. & Fast, N.M. (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual review of microbiology*, **56**, 93–116.

Ki, Y.-W., Lee, J.E., Park, J.H., Shin, I.C. & Koh, H.C. (2012) Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicology letters*, **211**, 18–28.

Kidner, J. & Moritz, R.A.F. (2013) The Red Queen Process does not Select for High Recombination Rates in Haplodiploid Hosts. *Evolutionary Biology*, **40**, 377–384.

Kim, S.-H. & Lee, W.-J. (2014) Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **3**, 116.

Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. a, Kremen, C., *et al.* (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, **274**, 303–13.

Kohen, R. & Nyska, A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**, 620–650.

Koudela, B., Kučerová, Š. & Hudcovic, T. (1999) Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitologica*, **46**, 171–174.

Kralj, J. & Fuchs, S. (2010) *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie*, **41**, 21–28.

Künzel, F. & Joachim, A. (2010) Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*, **106**, 299 – 309.

Künzel, F., Peschke, R., Tichy, A. & Joachim, A. (2014) Comparison of an indirect fluorescent antibody test with Western blot for the detection of serum antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in cats. *Parasitology Research*, **113**, 4457–4462.

Kuraishi, T., Hori, A. & Kurata, S. (2013) Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in physiology*, **4**, 375.

Kurze, C., Conte, Y. Le, Dussaubat, C., Erler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., *et al.* (2015) *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis. *Plos One*, **10**, e0140174.

Kurze

- Kurze, C., Mayack, C., Hirche, F., Stangl, G.I., Conte, Y. Le, Kryger, P., *et al.* (2016a) Nosema spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. *Parasitology Research*, **115**, 2381–2388.
- Kurze, C., Routtu, J. & Moritz, R.F.A. (2016b) Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, **119**, 290–297.
- Kwong, W.K., Engel, P., Koch, H. & Moran, N.A. (2014) Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**.
- Kwong, W.K. & Moran, N.A. (2016) Gut microbial communities of social bees. *Nature reviews. Microbiology*, **14**, 374–384.
- Ladas, A. (1972) L'influence de différents facteurs internes et externes sur la sensibilité des abeilles (*Apis mellifica L.*) à l'égard de deux produits phytosanitaires insecticides. *Apidologie*, **3**, 55–78.
- Leaver, M.J. & George, S.G. (1998) A Piscine Glutathione S-Transferase Which Efficiently Conjugates the End-Products of Lipid Peroxidation. *Marine Environmental Research*, **46**, 71–74.
- Lechenet, M., Dessaint, F., Py, G., Makowski, D. & Munier-Jolain, N. (2017) Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. *Nature Plants*, **3**, 17008.
- Lecocq, A., Jensen, A.B., Kryger, P. & Nieh, J.C. (2016) Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. *Scientific reports*, **6**, 22042.
- Lee, F.J., Rusch, D.B., Stewart, F.J., Mattila, H.R. & Newton, I.L.G. (2015a) Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology*, **17**, 796–815.
- Lee, K.-A., Kim, B., Bhin, J., Kim, D.H., You, H., Kim, E.-K., *et al.* (2015b) Bacterial Uracil Modulates *Drosophila* DUOX-Dependent Gut Immunity via Hedgehog-Induced Signaling Endosomes. *Cell Host & Microbe*, **17**, 191–204.
- Lee, K.-A., Kim, S.-H., Kim, E.-K., Ha, E.-M., You, H., Kim, B., *et al.* (2013) Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*, **153**, 797–811.
- Leiro, J., Cano, E., Ubeira, F.M., Orallo, F. & Sanmartín, M.L. (2004) In vitro effects of resveratrol on the viability and infectivity of the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 2497–2501.
- Lemaitre, B. & Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, **25**, 697–743.
- Levaditi, C., Nicolau, S. & Schoen, R. (1923) L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **89**, 985–988.
- Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K. & Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, **489**, 220–230.

Lü, J.-M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. & Debaquey, M.E. (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **14**, 840–860.

Luallen, R.J., Reinke, A.W., Tong, L., Botts, M.R., Félix, M.-A. & Troemel, E.R. (2016) Discovery of a Natural Microsporidian Pathogen with a Broad Tissue Tropism in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Pathogens*, **12**, e1005724.

Ludvigsen, J., rangberg, anbjørg, avershina, ekaterina, sekeLJa, M., kreibiCh, Cl., aMdaM, gro, et al. (2015) Shifts in the Midgut/Pyloric Microbiota Composition within a Honey Bee Apiary throughout a Season. *Microbes Environ*, **30**, 235–244.

Maes, P.W., A.P.Rodrigues, P., Oliver, R., Mott, B.M. & Anderson, K.E. (2016) Diet Related Gut Bacterial Dysbiosis Correlates with Impaired Development, Increased Mortality and Nosema Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 5439–5450.

Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., et al. (2017) *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **50**, 54–57.

Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., et al. (2011) Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research*, **109**, 605–612.

Martin, S.J., Hardy, J., Villalobos, E., Martín-Hernández, R., Nikaido, S. & Higes, M. (2013) Do the honeybee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus act synergistically? *Environmental Microbiology Reports*, **5**, 506–510.

Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H. & Hagiwara, S. (1959) A Case of *Encephalitozoon*-Like Body Infection in Man. *Arch. Pathol.*, **67**, 181–187.

Mayack, C., Natsopoulou, M.E. & McMahon, D.P. (2015) *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Molecular Biology*, **24**, 662–670.

Mayack, C. & Naug, D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of invertebrate pathology*, **100**, 185–8.

Mayack, C. & Naug, D. (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of insect physiology*, **56**, 1572–5.

Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L.P., Chauzat, M.-P., Claßen, C., et al. (2013) Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–60.

Meredith, A.L., Cleaveland, S.C., Brown, J., Mahajan, A. & Shaw, D.J. (2015) Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Wild Rodents, Foxes and Domestic Cats in Three Sites in the United Kingdom. *Transboundary and Emerging Diseases*, **62**, 148–156.

Michaud

Michaud, P., Laroche, C., Villay, A., Roussel, M., Diogon, M., Alaoui, H. El, *et al.* (2013) Utilisation de polysaccharides sulfatés pour le traitement de la nosérose des abeilles - Brevet n° WO2014076261 A1. 2013.

Mikhailov, K. V, Simdyanov, T.G. & Aleoshin, V. V. (2017) Genomic Survey of a Hyperparasitic Microsporidian *Amphiamblys sp.* (*Metchnikovellidae*). *Genome biology and evolution*, **9**, 454–467.

Milbrath, M.O., Tran, T. van, Huang, W.F., Solter, L.F., Tarpy, D.R., Lawrence, F., *et al.* (2015) Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **125**, 9–15.

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt. (2017) Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales - NOR: AGRG1320208A - Version consolidée au 01 juin 2017.

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt & Ministère de l'Ecologie du Développement durable et de l'Energie. (2016) *Plan Ecophyto II - Agro-écologie, produisons autrement. Agro-écologie - Produisons autrement.*

Moy, R.H. & Cherry, S. (2014) Antimicrobial autophagy: a conserved innate immune response in *Drosophila*. *Journal of Inate Immunity*, **5**, 444–455.

Müller, M., Mentel, M., Hellemond, J.J. van, Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., *et al.* (2012) Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews*, **76**, 444–95.

Nanetti, A., Rodriguez-García, C., Meana, A., Martín-Hernández, R. & Higes, M. (2015) Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Research in Veterinary Science*, **102**, 167–172.

Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L. & Yeh, J.Z. (2009) Glutamate-activated chloride channels: Unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **97**, 149–152.

Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A. (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunology*, **4**, 349–361.

Naug, D. & Gibbs, A. (2009) Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, **40**, 595–599.

Nazzi, F. & Conte, Y. Le. (2016) Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, **61**, 417–432.

Ndikumana, S., Pelin, A., Williot, A., Sanders, J.L., Kent, M. & Corradi, N. (2017) Genome Analysis of *Pseudoloma neurophilia*: A Microsporidian Parasite of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **64**, 18–30.

Nell

Nell, B., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A. & Maaß, G. (2015) *Encephalitozoon cuniculi* causes focal anterior cataract and uveitis in dogs. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, **43**, 337–344.

Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E. & Amdam, G. V. (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS biology*, **5**, e62.

Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařík, K., *et al.* (2014) Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Veterinary Parasitology*, **204**, 184–190.

Nicodemo, D., Jong, D. De, Couto, R.H.N. & Malheiros, E.B. (2013) Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores. *Genetics and Molecular Research*, **12**, 6931–6938.

Nicodemo, D., Maioli, M. a, Medeiros, H.C.D., Guelfi, M., Balieira, K.V.B., Jong, D. De, *et al.* (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, **33**, 2070–5.

Nikolenko, A.G., Saltykova, E.S. & Gaifullina, L.R. (2012) Molecular Mechanisms of Antioxidant Protective Processes in Honeybee *Apis mellifera*. In *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates : Molecular Aspects of Cell Signaling* (ed. by Farooqui, T. & Farooqui, A.A.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 279–293.

174

Nunes, F.M.F., Ihle, K.E., Mutti, N.S., Simões, Z.L.P. & Amdam, G. V. (2013) The gene vitellogenin affects microRNA regulation in honey bee (*Apis mellifera*) fat body and brain. *The Journal of experimental biology*, **216**, 3724–32.

Paldi, N. & Glick, E. (2014) Prevention and treatment of nosema disease in bees.

Paldi, N., Glick, E., Oliva, M., Zilberberg, Y., Aubin, L., Pettis, J., *et al.* (2010) Effective gene silencing in a microsporidian parasite associated with honeybee (*Apis mellifera*) colony declines. *Applied and environmental microbiology*, **76**, 5960–4.

Pan, G., Xu, J., Li, T., Xia, Q., Liu, S.-L., Zhang, G., *et al.* (2013) Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC genomics*, **14**, 1–14.

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. *Microbial Biotechnology*.

Park, J.H., Lee, J.E., Lee, S.-J., Park, S.J., Park, K.H., Jeong, M., *et al.* (2013) Potential autophagy enhancers protect against fipronil-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology letters*, **223**, 25–34.

Pasquale

Pasquale, G. Di, Salignon, M., Conte, Y. Le, Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., *et al.* (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLoS ONE*, **8**, 1–13.

Pasteur, L. (1870a) *Etudes sur la maladie des vers a soie - Tome I : La Pébrine et la Flacherie*. Paris.

Pasteur, L. (1870b) *Etudes sur la maladie des vers a soie - Tome II : Notes et Documents*. Paris.

Pavlov, I. (1954) Le réflexe conditionnel. In *Œuvres choisies* (ed. by Kochtoïanz, K.). Moscou, pp. 258–284.

Paxton, R.J., 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., Moteshareie, H., Sak, B., Selman, M., Naor, A., Eyahpaise, M.-È., *et al.* (2016) The genome of an *Encephalitozoon cuniculi* type III strain reveals insights into the genetic diversity and mode of reproduction of a ubiquitous vertebrate pathogen. *Heredity*, **116**, 458–465.

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 *Nosema ceranae*. *Environmental Microbiology*, **17**, 4443–4458.

Peng, Y., Baer-Imhoof, B., Harvey Millar, A. & Baer, B. (2015) Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Scientific Reports*, **5**, 10565.

Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R. & VanEngelsdorp, D. (2013) Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, **8**, e70182.

Pettis, J.S., 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.

Peuvel, I., Delbac, F., Metenier, G., Peyret, P. & Vivares, C.P. (2000) Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Parasitology*, **121 Pt 6**, 581–7.

Peyretailade, E., Gonçalves, O., Terrat, S., Dugat-Bony, E., Wincker, P., Cornman, R.S., *et al.* (2009) Identification of transcriptional signals in *Encephalitozoon cuniculi* widespread among Microsporidia phylum: support for accurate structural genome annotation. *BMC Genomics*, **10**, 1–13.

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., *et al.* (2015) Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 68–102.

Pombert, J.-F., Haag, K.L., Beidas, S., Ebert, D. & Keeling, P.J. (2015) The *Ordospora colligata* genome: Evolution of extreme reduction in microsporidia and host-to-parasite horizontal gene transfer. *mBio*, **6**, e02400-14.

Pombert

Pombert, J.-F., Selman, M., Burki, F., Bardell, F.T., Farinelli, L., Solter, L.F., *et al.* (2012) Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 12638–12643.

Pombert, J.-F., Xu, J., Smith, D.R., Heiman, D., Young, S., Cuomo, C.A., *et al.* (2013) Complete Genome Sequences from Three Genetically Distinct Strains Reveal High Intraspecies Genetic Diversity in the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Eukaryotic Cell*, **12**, 503–511.

Porrini, M.P., Sarlo, E.G., Medici, S.K., Garrido, P.M., Porrini, D.P., Damiani, N., *et al.* (2011) *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *Journal of Apicultural Research*, **50**, 35–41.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. & Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, **25**, 345–53.

Powell, J.E., Leonard, S.P., Kwong, W.K., Engel, P., Moran, N.A. & Mcfall-Ngai, M.J. (2016) Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, 13887–13892.

Ptaszyńska, A.A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M. & Małek, W. (2016a) Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C? *Parasitology Research*, **115**, 397–406.

Ptaszyńska, A.A., Paleolog, J. & Borsuk, G. (2016b) *Nosema ceranae* Infection Promotes Proliferation of Yeasts in Honey Bee Intestines. *PLoS One*, **11**, e0164477.

Råberg, L., Graham, A.L. & Read, A.F. (2009) Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 37–49.

Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 26464–26472.

Ramírez-Puebla, S.T., Servín-Garcidueñas, L.E., Jiménez-Marín, B., Bolaños, L.M., Rosenblueth, M., Martínez, J., *et al.* (2013) Gut and root microbiota commonalities. *Applied and environmental microbiology*, **79**, 2–9.

Rand, E.E. du, Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W. & Nicolson, S.W. (2015) Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, **5**, 11779.

Ratiu, A.C., Neagu, A., Mihalache, M.R., Lazar, V. & Ecovoiu, A. Al. (2016) Molecular and bioinformatics analysis of the relative expression profiles of dorsal, *Toll-1*, *Relish* and *Duox* genes in young versus old diutinus workers of *Apis mellifera*. *Romanian Biotechnological Letters*, **21**.

Ravoet

Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., Smet, L. De, Wenseleers, T., Smagghe, G., *et al.* (2013) Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellifica* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS One*, **8**, e72443.

Raymann, K., Shaffer, Z. & Moran, N.A. (2017) Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology*, **15**, e2001861.

Reinke, A.W., Balla, K.M., Bennett, E.J., Troemel, E.R. & Nesvizhskii, A.I. (2017) Identification of microsporidia host-exposed proteins reveals a repertoire of rapidly evolving proteins. *Nature Communications*, **8**, 1–11.

Renzi, M.T., Amichot, M., Pauron, D., Tchamitchian, S., Brunet, J.-L., Kretzschmar, A., *et al.* (2016) Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **127**, 205–213.

Retschnig, G., Williams, G.R., Mehmman, M.M., Yañez, O., Miranda, J.R. de & Neumann, P. (2014) Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS one*, **9**, e85261.

Reybroeck, W., Daeseleire, E., Brabander, H.F. De & Herman, L. (2012) Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*, **158**, 1–11.

Roat, T.C., Carvalho, S.M., Palma, M.S. & Malaspina, O. (2017) Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **36**, 1652–1660.

Roberts, K.E., Evison, S.E.F., Baer, B. & Hughes, W.O.H. (2015) The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*, **5**, 10982.

Romero, A., Ramos, E., Ares, I., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, M.R., *et al.* (2016) Fipronil sulfone induced higher cytotoxicity than fipronil in SH-SY5Y cells: Protection by antioxidants. *Toxicology Letters*, **252**, 42–49.

Rönnebäumer, K., Gross, U. & Bohne, W. (2008) The Nascent Parasitophorous Vacuole Membrane of *Encephalitozoon cuniculi* Is Formed by Host Cell Lipids and Contains Pores Which Allow Nutrient Uptake. *Eucaryotic Cell*, **7**, 1001–1009.

Rosales, C. (2017) Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. In *Insect Physiology and Ecology*. p. 262.

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.

Roussel, A.-M. & Ferry, M. (2002) Stress oxydant et vieillissement - Oxidative stress, nutrition and aging. *Cancer Research*, **16**, 285–291.

Roussel, M. (2011) *Thèse : Séquençage du génome du parasite intestinal Blastocystis sp. (ST7) : vers une meilleure compréhension des capacités métaboliques d'organites apparentés aux mitochondries chez ce microorganisme anaérobie.*

Roussel, M., Villay, a, Delbac, F., Michaud, P., Laroche, C., Roriz, D., *et al.* (2015) Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nose-mosis. *Carbohydrate Polymers*, **133**, 213–220.

Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R., *et al.* (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PloS one*, **6**, e20656.

Russell, J.A., Moreau, C.S., Goldman-Huertas, B., Fujiwara, M., Lohman, D.J. & Pierce, N.E. (2009) Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 21236–21241.

Sabree, Z.L., Hansen, A.K. & Moran, N.A. (2012) Independent studies using deep sequencing resolve the same set of core bacterial species dominating gut communities of honey bees. *PLoS ONE*, **7**.

Scharf, M.E., Siegfried, B.D., Meinke, L.J. & Chandler, L.D. (2000) Fipronil metabolism, oxidative sulfone formation and toxicity among organophosphate- and carbamate-resistant and susceptible western corn rootworm populations. *Pest Management Science*, **56**, 757–766.

Schlüns, H. & Crozier, R.H. (2007) Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*, **16**, 753–759.

Schmid, M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W.W., Stanley, D.W. & Tautz, J. (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, **54**, 439–444.

Schwarz, R.S. & Evans, J.D. (2013) Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology*, **40**, 300–310.

Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G. V. (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 962–967.

Sharma, S., Balne, P.K. & Das, S. (2014) Ocular Microsporidiosis. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (ed. by Weiss, L.M. & Becnel, J.J.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 403–419.

Shokolenko, I., Venediktova, N., Bochkareva, A., Wilson, G.L. & Alexeyev, M.F. (2009) Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, **37**, 2539–2548.

Simeunovic

- Simeunovic, P., Stevanovic, J., Cirkovic, D., Radojicic, S., Lakic, N., Stanistic, L., *et al.* (2014) Nosema ceranae and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research*, **53**, 545–554.
- Smith, M.L. (2012) The honey bee parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via food exchange? *PLoS ONE*, **7**, 1–6.
- Solter, L.F. (2014) Epizootiology of Microsporidiosis. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (ed. by Weiss, L.M. & Becnel, J.J.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 165–194.
- Southern, T.R., Jolly, C.E., Lester, M.E. & Hayman, J.R. (2007) EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryotic cell*, **6**, 1354–62.
- Sprague, V. & Vávra, J. (1977) *Comparative Pathobiology - Volume 2: Systematics of the Microsporidia*. Plenum Pre. New York and London.
- Sun, X., Komatsu, T., Lim, J., Laslo, M., Yolitz, J., Wang, C., *et al.* (2012) Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell*, **11**, 783–93.
- Swanson, J.A.I., Torto, B., Kells, S.A., Mesce, K.A., Tumlinson, J.H. & Spivak, M. (2009) Odorants that Induce Hygienic Behavior in Honeybees: Identification of Volatile Compounds in Chalkbrood-Infected Honeybee Larvae. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 1108–1116.
- Taju, S., Tilahun, Y., Ayalew, M., Fikrie, N., Schneider, J. & Kempen, J.H. (2011) Diagnosis and treatment of microsporidial keratoconjunctivitis: literature review and case series. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, **1**, 105–110.
- Taupin, V. (2006) *Thèse : La différenciation sporale chez les microsporidies : imagerie 3D et isolement des stades de d'analyse de l'expression différentielle de protéines structurales et première identification des glycanes.*
- Tavares, D.A., Dussaubat, C., Kretzschmar, A., Carvalho, S.M., Silva-Zacarin, E.C.M., Malaspina, O., *et al.* (2017) Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental Pollution*, **229**, 386–393.
- Terry, R.S., Smith, J.E., Sharpe, R.G., Rigaud, T., Littlewood, D.T.J., Ironside, J.E., *et al.* (2004) Widespread vertical transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum Microspora. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **271**, 1783–1789.
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., Alaoui, H. El & Delbac, F. (2010) Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Current opinion in microbiology*, **13**, 443–9.
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, **443**, 931–949.

Thélohan

Thélohan, P. (1894) *Note sur la présence d'une capsule à filament dans les spores des Microsporidies. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences.* GAUTHIER-VILLARS ET FILS, IMPRIMEURS-LIBRAIRES DES COMPTES RENDUS DES SÉANCES DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES, Quai des Grands-Augustins, 55, Paris.

Toplak, I., Ciglencčki, 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.

Traver, B.E. & Fell, R.D. (2011) *Nosema ceranae* in drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of invertebrate pathology*, **107**, 234–6.

Traver, B.E. & Fell, R.D. (2012) Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *Journal of Invertebrate Pathology*, **110**, 408–410.

Tritschler, M., Retschnig, G., Yañez, O., Williams, G.R. & Neumann, P. (2017) Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*. *Ecology and Evolution*.

Troemel, E.R. & Becnel, J.J. (2015) Genome analysis and polar tube firing dynamics of mosquito-infecting microsporidia. *Fungal Genetics and Biology*, **83**, 41–44.

Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A. V, Lucocq, J.M., Hirt, R.P. & Embley, T.M. (2008) A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, **453**, 553–557.

180

Tsukada, R., Osaka, Y., Takano, T., Sasaki, M., Inose, M. & Ikadai, H. (2016) Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in cats in Japan. *Parasitology*, **78**, 1615–1617.

Underwood, R.M. & Currie, R.W. (2009) Indoor Winter Fumigation With Formic Acid for Control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and Nosema Disease, *Nosema* sp. *Journal of Economic Entomology*, **102**, 1729–1736.

Ursini, F. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.*, **252**, 38–53.

VanEngelsdorp, D. & Meixner, M.D. (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.

Vávra, J. & Lukeš, J. (2013) Microsporidia and “The Art of Living Together.” In *Advances in Parasitology* (ed. by Elsevier). pp. 253–320.

Verbeke, M., Quintens, J., Jacobs, F., Bohyn, W. & Rycke, P. De. (1985) La formation des membranes péritrophiques dans l'abeilles pré-adulte (*Apis mellifera* L.) (*Hymenoptera, Apidae*). *Actes des Colloques Insectes Sociaux*, 141–145.

Vidau, C. (2009) *Thèse : Effets et mode d'action secondaire d'un insecticide Phénylpyrazole, le Fipronil. Etude de la cytotoxicité sur des modèles entérocytaire et neuronal humains.*

Vidau

Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J.-L., *et al.* (2011a) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PloS one*, **6**, e21550.

Vidau, C., González-Polo, R. a, Niso-Santano, M., Gómez-Sánchez, R., Bravo-San Pedro, J.M., Pizarro-Estrella, E., *et al.* (2011b) Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology*, **32**, 935–43.

Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Gall, M. Le, *et al.* (2014) Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of invertebrate pathology*, **121**, 89–96.

Wagnerová, P., Sak, B., Květ Nová, D., Natová, Z.B., Civišová, H., Maršálek, M., *et al.* (2012) *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, **190**, 573–577.

Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., *et al.* (2013) Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of Molecular Medicine*, **91**, 917–927.

Wardman, P. & Candeias, L.P. (1996) Fenton chemistry: an introduction. *Radiation Research*, **145**, 523–531.

Watson, A.K., Williams, T.A., Williams, B.A.P., Moore, K.A., Hirt, R.P. & Embley, T.M. (2015) Transcriptomic profiling of host-parasite interactions in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *BMC Genomics*, **16**, 983.

Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. & Owen, R.L. (1994) Human Microsporidial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **7**, 426–461.

Weiss, L.M., Delbac, F., Hayman, J.R., Pan, G., Dang, X. & Zhou, Z. (2014) The Microsporidian Polar Tube and Spore Wall. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (ed. by Weiss, L.M. & Becnel, J.J.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 261–306.

Wenfeng, L., Evans, J.D., Huang, Q., Rodríguez-García, C., Liu, J., Hamilton, M., *et al.* (2016) Silencing honey bee (*Apis mellifera*) naked cuticle (*nkd*) improves host immune function and reduces *Nosema ceranae* infections. *Applied and environmental microbiology*, **82**, 6779–6787.

White, G.F. (1919) *Nosema-Disease*. United Sta. Washington.

Williams, G.R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., *et al.* (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, **52**, 1–36.

Williams, G.R., Shutler, D., Burgher-Maclellan, K.L. & Rogers, R.E.L. (2014) Infra-Population and -Community Dynamics of the Parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and Consequences for Honey Bee (*Apis mellifera*) Hosts. *Plos One*, **9**, e99465.

Williams

Williams, T.A., Nakjang, S., Campbell, S.E., Freeman, M.A., Eydal, M., Moore, K., *et al.* (2016) A Recent Whole-Genome Duplication Divides Populations of a Globally Distributed Microsporidian. *Molecular biology and evolution*, **33**, 2002–2015.

Wiredu Boakye, D., Jaroenlak, P., Prachumwat, A., Williams, T.A., Bateman, K.S., Itsathitphaisarn, O., *et al.* (2017) Decay of the glycolytic pathway and adaptation to intranuclear parasitism within *Enterocytozoonidae* microsporidia. *Environmental Microbiology*, **19**, 2077–2089.

Wood, Z.A., Schröder, E., Harris, J.R. & Poole, L.B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences*, **28**, 32–40.

Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M. & Sheppard, W.S. (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, **109**, 326–329.

Wu, K. & Hoy, M.A. (2016) The Glutathione-S-Transferase, Cytochrome P450 and Carboxyl/Cholinesterase Gene Superfamilies in Predatory Mite *Metaseiulus occidentalis*. *PLoS One*, **11**, e0160009.

Wu, Z., Li, Y., Pan, G., Li, C., Hu, J., Liu, H., *et al.* (2007) A Complete Sec61 Complex in *Nosema Bombycis* and Its Comparative Genomics Analyses. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, **54**, 379–380.

Xiao, Y., Li, X., Cui, Y., Zhang, J., Liu, L., Xie, X., *et al.* (2014) Hydrogen peroxide inhibits proliferation and endothelial differentiation of bone marrow stem cells partially via reactive oxygen species generation. *Life sciences*, **112**, 33–40.

Xu, C.C., Yang, S.F., Zhu, L.H., Cai, X., Sheng, Y.S., Zhu, S.W., *et al.* (2014) Regulation of N-acetyl cysteine on gut redox status and major microbiota in weaned piglets 1. *Journal of Animal Science*, **92**, 1504–1511.

Yakes, F.M. & Houten, B. Van. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 514–9.

Yu, S.-W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., *et al.* (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 18314–9.

Yu, S.J., Robinson, F.A. & Nation, J.L. (1984) Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **22**, 360–368.

Zaluski, R., Kadri, S.M., Alonso, D.P., Martins Ribolla, P.E. & Oliveira Orsi, R. De. (2015) Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **34**, 1062–1069.

Zee

Zee, R. Van der, Gómez-Moracho, T., Pisa, L., Sagastume, S., García-Palencia, P., Maside, X., *et al.* (2014) Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*). *Environmental Microbiology Reports*, **6**, 401–413.

Zhang, H., Huang, H., Cali, A., Takvorian, P.M., Feng, X., Zhou, G., *et al.* (2005) Investigations into microsporidian methionine aminopeptidase type 2: a therapeutic target for microsporidiosis. *Folia Parasitol (Prapha)*, **52**, 182–192.

Zheng, H.-Q., Gong, H.-R., Huang, S.-K., Sohr, A., Hu, F.-L. & Chen, Y.P. (2015) Evidence of the synergistic interaction of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and Deformed wing virus. *Veterinary Microbiology*, **177**, 1–6.

Zheng, H.-Q., Lin, Z.-G., Huang, S.-K., Sohr, A., Wu, L. & Chen, Y.P. (2014) Spore Loads May Not be Used Alone as a Direct Indicator of the Severity of *Nosema ceranae* Infection in Honey Bees *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae). *Apiculture and Social Insects*, **107**, 2037–2044.

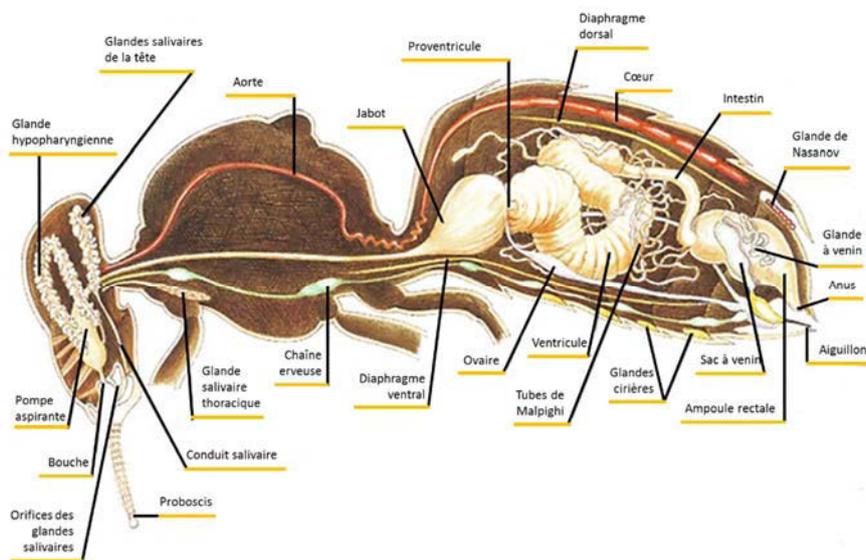
Annexes

Annexe 1 : Taille des génomes microsporidiens

Tableau réalisé à partir de données de séquençages collectées dans NCBI Génome le 04/05/2017.

Espèce microsporidienne	Souche	GenBank, NCBI version	Taille (Mpb)	Nbre de protéines	% GC	Version	Références
<i>Encephalitozoon romaleae</i>	SJ-2008	NC_024905.1	2,19	1831	40,3	19/07/2012	(Pombert <i>et al.</i> , 2012)
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	ATCC 50506	NC_014425.1	2,22	1939	41,5	16/08/2010	(Corradi <i>et al.</i> , 2010; Pombert <i>et al.</i> , 2012)
<i>Encephalitozoon hellem</i>	ATCC 50504	NC_018479.1	2,25	1847	43,4	28/06/2012	(Pombert <i>et al.</i> , 2012)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EC3	AEWR01000001.1	2,26	-	46,8	11/08/2014	(Pombert <i>et al.</i> , 2013)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EC2	AEWQ01000001.1	2,28	-	46,9	11/08/2014	(Pombert <i>et al.</i> , 2013)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EC1	AEWD01000001.1	2,29	-	46,9	11/08/2014	(Pombert <i>et al.</i> , 2013)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EcunIII-L	LFTZ01000015.1	2,29	1834	46,9	15/07/2015	(Pelín <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ordospora colligata</i>	OC4	NW_014575407.1	2,29	1820	38,5	17/12/2014	(Pombert <i>et al.</i> , 2015)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	GB-M1	NC_003237.1	2,50	1996	47,3	27/02/2015	(Katinka <i>et al.</i> , 2001; Peyretailade <i>et al.</i> , 2009)
<i>Nematocida displodere</i>	JUm2807-1	LTDL01000014.1	3,07	2278	49,1	11/05/2016	(Luallen <i>et al.</i> , 2016)
<i>Enterospora cancri</i>	GB1	LWDP01000001.1	3,10	2169	40,2	12/04/2017	(Wiredu Boakye <i>et al.</i> , 2017)
<i>Vittaforma corneae</i>	ATCC 50505	NW_006889834.1	3,21	2239	36,7	23/07/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , n.d.)
<i>Enterocytozoon hepatopenaei</i>	TH1	MNPJ01000014.1	3,25	2536	25,5	06/04/2017	(Wiredu Boakye <i>et al.</i> , 2017)
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	H348	NW_001849444.1	3,86	3632	33,7	12/04/2017	(Corradi <i>et al.</i> , 2007; Akiyoshi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Nematocida parisii</i>	ERTm1	NW_013524646.1	4,07	2661	34,6	11/08/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nematocida parisii</i>	ERTm3	GL870876.1	4,15	2726	34,5	11/08/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nematocida sp.</i>	ERTm6	AKIJ01000001.1	4,26	2770	38,4	22/10/2014	(Bakowski <i>et al.</i> , 2014)
<i>Nematocida sp.</i>	ERTm5	LTDK01000174.1	4,40	2709	33,5	11/05/2016	(Reinke <i>et al.</i> , 2017)
<i>Hepatospora eriocheir</i>	GB1 NODE_1127	LVKB01000001.1	4,57	2691	22,4	12/04/2017	(Wiredu Boakye <i>et al.</i> , 2017)
<i>Nematocida sp.</i>	ERTm2	JH604633.1	4,70	2433	38,4	11/08/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , 2012)
<i>Hepatospora eriocheir</i>	<i>cancrici</i>	LTAI01000001.1	4,83	3052	23,2	12/04/2017	(Wiredu Boakye <i>et al.</i> , 2017)
<i>Spraguea lophii</i>	42_110	ATCN01001135.1	4,98	2499	23,4	12/09/2013	(Campbell <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudoloma neurophilia</i>	MK NODE_1	LGUB01000001.1	5,25	3644	29,6	05/11/2015	(Ndikumana <i>et al.</i> , 2017)
<i>Amphiambls sp.</i>	WSBS2006	MKPU01000001.1	5,62	3642	50,2	10/11/2016	(Mikhailov <i>et al.</i> , 2017)
<i>Mitosporidium daphniae</i>	UPG3	NW_013546622.1	5,64	3330	43,0	30/09/2014	(Haag <i>et al.</i> , 2014)
<i>Spraguea lophii</i>	EM120	LDWE01000010.1	5,76	-	23,2	02/12/2016	(Williams <i>et al.</i> , 2016)
<i>Spraguea lophii</i>	RA12034	LDXA01000083.1	5,80	-	23,1	02/12/2016	(Williams <i>et al.</i> , 2016)
<i>Spraguea lophii</i>	North Atlantic	MQSS01000438.1	5,85	-	23,2	02/12/2016	(Williams <i>et al.</i> , 2016)
<i>Vavraia culicis</i>	<i>floridensis</i>	NW_007360604.1	6,12	2773	39,9	17/03/2011	(Cuomo <i>et al.</i> , n.d.)
<i>Nosema ceranae</i>	PA08 1199	JPQZ01000001.1	5,69	3264	25,4	05/05/2015	(Pelín <i>et al.</i> , 2015)
<i>Nosema ceranae</i>	BRL01	NW_003314260.1	7,86	2376	25,3	04/08/2014	(Cornman <i>et al.</i> , 2009)
<i>Trachipleistophora hominis</i>		JH993832.1	8,49	3212	35,3	13/08/2013	(Heinz <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nosema apis</i>	BRL01	KE647164.1	8,57	2764	18,9	13/08/2013	(Chen <i>et al.</i> , 2013)
<i>Anncaliia algerae</i>	PRA339	KK365130.1	12,16	3598	28,1	06/05/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , n.d.)
<i>Hamiltosporidium tvaerminnensis</i> (ex <i>Octospora bayeri</i>)	OER-3-3	GCA_000180835.1	13,27	-	26,5	30/09/2009	(Corradi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Anncaliia algerae</i>	PRA109	KK358017.1	17,53	5245	28,6	06/05/2014	(Cuomo <i>et al.</i> , n.d.)
<i>Nosema bombycis</i>	CQ1	KB908914.1	15,69	4468	32,3	10/04/2013	(Wu <i>et al.</i> , 2007; Pan <i>et al.</i> , 2013)
<i>Edhazardia aedis</i>		AFBI03000001.1	51,35	4190	22,8	14/10/2011	(Desjardins <i>et al.</i> , 2015)

Annexe 2 : Anatomie d'une abeille ouvrière adulte



Le **système digestif** est situé principalement dans l'abdomen. Il prend naissance dans la bouche, se prolonge en hypopharynx et pharynx, puis en œsophage débouchant sur le jabot. Le jabot est un organe clé de la digestion et de l'absorption, puisqu'il permet d'orienter les produits de la digestion vers la bouche ou vers l'intestin. Ce dernier est divisé en trois parties : le proventricule, le ventricule et l'iléum. Le ventricule, qui a pour fonction la sécrétion d'enzymes digestives, est séparé de l'iléum par le pylore qui porte la base des tubes de Malpighi, qui filtrent notamment les déchets azotés de l'hémolymphe vers l'intestin. Les déchets solides de la digestion qui transitent dans l'intestin s'accumulent dans l'ampoule rectale et sont évacués durant les vols de propreté.

186

L'abeille possède un **système circulatoire** ouvert qui est constitué d'un vaisseau dorsal allant de l'extrémité de l'abdomen à la tête. L'hémolymphe, réservoir d'eau et de glucose, permet la circulation de nombreux constituants minéraux et organiques, de protéines et d'enzymes. L'hémolymphe est donc prélevée dans l'abdomen puis projetée par cinq cœurs dans l'aorte thoracique, pour déboucher dans la tête de l'abeille. Ainsi le système circulatoire permet le transport des différents éléments nécessaires aux cellules, mais aussi des cellules immunitaires nommées hémocytes.

Le **système nerveux** de l'abeille est constitué de deux éléments : le système nerveux central, avec le cerveau et la chaîne nerveuse ventrale, et le système stomatogastrique dont fait partie le système nerveux entérique contrôlant l'intestin de l'abeille.

La respiration des abeilles s'effectue au moyen d'un réseau de sacs aériens présents dans tout le corps de l'insecte, et des trachées débouchant sur 10 paires de stigmates s'ouvrant ou se fermant, permettant un apport direct de l'O₂ (tandis que le CO₂ est éliminé par l'hémolymphe) (d'après Le Traité rustica de l'Apiculture, Clément et al. 2013).

Annexe 3 : Principaux agresseurs des colonies d'abeilles

Tableau des principaux agresseurs des colonies d'abeilles (pathogènes, prédateurs), classés par niveau de dangerosité à partir du Guide des bonnes pratiques apicoles (Santé des colonies, ITSAP, www.itsap.asso.fr), ainsi que de l'arrêté ministériel du 29 Juillet 2013 (NOR: AGRG1320208A). * : l'ANSES a également classé comme danger de 3^{ème} catégorie pour les abeilles les virus ABPV, BQCV, DWV, IAPV et KBV, ainsi que l'insecte *Braula coeca* (pou de l'abeille) et l'acarien *Acarapis woodi* (responsable de l'acariose des trachées).

Niveau	Agent	Espèces (maladie)	Détection	Moyens de lutte
Dangers de 1 ^{ère} catégorie (à déclaration obligatoire)	Acarien	<i>Tropilaelaps spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> Dégâts similaires à ceux du <i>Varroa</i> Perte de couvain et d'abeilles Opércule avec de petits trous 	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la colonie infectée
	Bactérie	<i>Paenibacillus larvae</i> (Loque américaine)	<ul style="list-style-type: none"> Couvain en mosaïque à odeur putride Opércule de couvain mou, noirâtre, concave et perforé Écailles brunâtres adhérentes aux parois de l'alvéole Putréfaction des larves et des nymphes puis liquéfaction Larve filante au contact d'un bâtonnet 	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la colonie infectée <p><u>Remarque</u> : les antibiotiques sont interdits car inefficaces contre la forme sporulée de la bactérie. Ils permettent une rémission temporaire mais masquent les signes cliniques sans éradiquer l'infection. Les antibiotiques pourraient également se retrouver dans les différentes matrices de la ruche.</p>
	Champignon	<i>Nosema apis</i> (Nosérose des abeilles)	<ul style="list-style-type: none"> Dysenteries plus ou moins importantes Difficulté de vol 	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la colonie infectée
	Insecte nuisible	Petit coléoptère de la ruche : <i>Aethina tumida</i>	<ul style="list-style-type: none"> Destruction du couvain, du miel et du pain d'abeille Présence de galeries dans les cadres 	<ul style="list-style-type: none"> Élimination de la colonie infectée
Dangers de 2 ^{ème} catégorie	Acarien	<i>Varroa destructor</i> (Varroose)	<ul style="list-style-type: none"> Abeilles émergentes malformées (abdomens raccourcis, déformation des ailes) Couvain en mosaïque Présence du parasite dans le couvain et dans le fond de la ruche Affaiblissement général de la colonie 	<ul style="list-style-type: none"> Piégeage dans le couvain, de préférence de mâle Constitution d'essaims artificiels avec rupture de ponte Traitements chimiques (thymol, tau-fluvalinate, amitraze, acide oxalique)
	Prédateur	Frelon asiatique – insecte Hyménoptère : <i>Vespa velutina</i>	<ul style="list-style-type: none"> Diminution ou arrêt de l'activité de butinage Présence du prédateur autour des ruches 	<ul style="list-style-type: none"> Piégeage des reines fondatrices Destruction des nids
Dangers de 3 ^{ème} catégorie	Bactérie	<i>Melissococcus plutonius</i> (Loque européenne)	<ul style="list-style-type: none"> Couvain en mosaïque Mort du couvain ouvert Jaunissement des larves Écailles brunâtres adhérentes aux parois de l'alvéole 	<ul style="list-style-type: none"> Destruction des colonies très atteintes Transvasement des colonies faiblement atteintes Apport de protéines pour éviter les carences <p><u>Remarques</u> : antibiotiques non recommandés.</p>
	Champignon	<i>Nosema ceranae</i> (Nosérose des abeilles)	<ul style="list-style-type: none"> Souvent asymptomatique 	<ul style="list-style-type: none"> Changement de la reine Élimination des colonies les plus atteintes
		<i>Ascosphaera apis</i> (Couvain plâtré)	<ul style="list-style-type: none"> Pré-pupes recouvertes d'un duvet mycélien blanc puis momification des larves Couvain calcifié présent devant la ruche Couvain en mosaïque, opércules déchirées 	<ul style="list-style-type: none"> Remplacement de la reine Élimination de la colonie trop affaiblie
	Insectes nuisibles Lépidoptères	<i>Achroea grisella</i> et <i>Galleria mellonella</i> (Couvain chauve)	<ul style="list-style-type: none"> Bourrelet de cire autour des alvéoles qui ne sont pas operculées Excréments de larves de teignes, parfois toile tissée 	<ul style="list-style-type: none"> Renouvellement des cadres Destruction des cadres envahis
	Virus*	<i>Sacbrood Bee Virus</i> , SBV (Couvain sacciforme)	<ul style="list-style-type: none"> Couvain en mosaïque, avec opércules similaires à la loque américaine Pré-pupes mortes, brunâtres avec la tête visible et plus foncée Momification des larves 	<ul style="list-style-type: none"> Élimination des cadres de couvain les plus atteints Transvasement des colonies Remplacement de la reine
<i>Chronic Bee Paralysis</i> , CBPV (Maladie noire)		<ul style="list-style-type: none"> Dépilation des abeilles (abeilles noires) Abeilles tremblantes et rampantes, repoussées par les gardiennes Ailes et pièces buccales étendues et abdomens gonflés 	<ul style="list-style-type: none"> Remplacement de la reine Déplacement de la colonie Élimination de la colonie trop affaiblie 	

