



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par:

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Gaël Charpentier

le Mercredi 3 Juillet 2013

Titre :

Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées *in vitro*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Unité de recherche :

Equipe Venin et Activités Biologiques, EA 4357

Directeur(s) de Thèse :

Angélique Vétillard - Maître de Conférences, CUFR Champollion, Albi

Claude Maranges - Professeur, INSA de Toulouse

Rapporteurs :

Luc Belzunces - Directeur de recherches, INRA Avignon

Frederic Delbac - Professeur, Université Clermont-Ferrand II

Autre(s) membre(s) du jury :

Monique Gauthier - Professeur, Université de Toulouse III

Marc-Édouard Colin - Chargé de recherche, SupAgro Montpellier

RESUME

Résumé : L'acarien *Varroa destructor*, ectoparasite de l'abeille *Apis mellifera* adulte et de son couvain, joue un rôle de première importance dans le phénomène de mortalité des colonies. Parmi les acaricides employés pour lutter contre ce parasite, les huiles essentielles sont apparues comme une alternative efficace et naturelle à la chimie. Le thymol, principe actif majoritaire de l'huile essentielle de thym est en particulier couramment utilisé pour traiter les colonies pendant le pic d'infestation ayant lieu avant l'arrivée de la mauvaise saison. Toutefois, des données récentes suggèrent que le thymol s'accumule dans tous les produits de la ruche et induit une mortalité larvaire. Or la survie de la colonie pendant l'hiver et son redémarrage au printemps dépend directement des abeilles nées après ce traitement.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont consisté à investiguer pour la première fois les effets létaux et sublétaux du thymol sur le développement larvaire suite à une exposition aiguë et chronique. Pour cela, des larves d'abeilles ont été élevées *in vitro* selon la méthode développée par Aupinel et al., (2005) adaptée pour la circonstance à l'élevage d'un grand nombre de larves.

Nous avons ainsi pu établir que le thymol était un composé moyennement toxique pour les larves d'abeilles exposées de manière aiguë *via* la cire ou la nourriture puisque les CL50 aiguës du thymol sont élevées et respectivement de 2100 mg de thymol/kg de cire et de 2000 mg de thymol/kg de nourriture. De même, la DL50 aiguë du thymol *via* la nourriture est de 0,044 mg de thymol/larve, ce qui est largement supérieur à celles d'autres pesticides administrés oralement et ne témoigne pas d'une sensibilité particulière de l'abeille à ce composé. Les CL50 chroniques sont quant à elles de 690 mg de thymol/kg de cire et de 700 mg de thymol/kg de nourriture traduisant que les larves sont plus sensibles à une exposition chronique au thymol qu'à une exposition aiguë. Le ratio toxicité aiguë/toxicité chronique du thymol indique quant à lui que la toxicité chronique du thymol est relativement faible.

En revanche, le thymol induit des effets sublétaux sur les larves, avec comme effets les plus marqués : un retard de croissance à la fin du stade larvaire probablement en lien avec une forte augmentation de l'expression de la vitellogénine à ce stade à partir de la concentration 50 mg/kg ; une augmentation de l'expression de l'abaecine pour la concentration 1000 mg/kg de nourriture ainsi qu'une augmentation de l'expression du lysozyme à une concentration de 100 mg/kg de nourriture traduisant probablement une activation du système immunitaire.

Enfin, la comparaison de nos résultats avec les données de la littérature montrent que les concentrations de résidus de thymol retrouvées en particulier dans la cire présenteraient un danger pour les abeilles au cours du développement larvaire, accentué pour les jeunes larves relativement plus exposées que les autres eu égard à leur petite taille.

Mots-clés : *Apis mellifera*, thymol, élevage *in vitro*, toxicité aiguë et chronique, effets létaux et sublétaux, développement, immunité, détoxification, vitellogénine, Glutathion S-Transférase, PCR en temps réel, activité enzymatique.

Abstract: The acarian *Varroa destructor*, is a parasite of both adult and brood European honey bees *Apis mellifera*. It is considered to play a major role in the phenomenon of overwintering mortality of the colonies. Among the acaricides used to fight the mite, essential oils seem to constitute an effective and natural alternative to chemicals. Thymol, the major active constituent of thyme essential oils, is commonly used to treat colonies at the beginning of the autumn, after the honey harvest and during the peak of infestation. However, recent data reveal that Thymol accumulates in all bee products and induces larval mortality. Yet, the brood present in the hive when treatments are applied, produces winter bees that will ensure the survival of the colony during winter and a resilient restart of the colony the following spring.

In such a context, our experiments were conducted to investigate, for the first time, lethal and sublethal effects of acute and chronic thymol exposure during larval development. With this aim, honey bee larvae were reared *in vitro* following the method described by Aupinel et al. (2005) and adapted in our studies for rearing large number of larvae.

We showed Thymol to be a moderately toxic compound to honey bee larvae exposed to acute toxicity with contaminated beeswax or food since acute thymol CL50 are high, reaching respectively 2100 mg of thymol/kg of wax and 2000 mg of thymol/kg of food. Also, acute thymol DL50 with contaminated food is 0,044 mg of thymol/larva, which is higher when compared to others known pesticides administrated orally. Consequently, it does not reflect a specific sensitivity of the bee to this compound. Chronic CL50 are 690 mg of thymol/kg of wax and 700 mg of thymol/kg of food, indicating that larvae are more sensitive to chronic exposure than acute exposure. The ratio thymol acute toxicity/thymol chronic toxicity reveals that chronic toxicity is relatively low.

On the contrary, thymol induces sublethal effects on larvae, with the following main marked effects : a delay in weight gain at the end of the larval stage which is probably linked to the significant increase of vitellogenin expression at the same stage starting from the concentration of 50 mg of thymol/kg of food ; an increase of abaecin expression with a concentration of 1000 mg of thymol/kg of food and an increase of lysozyme expression with a concentration of 100 mg of thymol/kg of food suggesting an activation of the immune system.

Finally, the comparison of our results with available data shows that concentrations of thymol residues found particularly into beeswax would represent a risk for honey bee larval development, emphasized in early stages rather more exposed than others due to their tiny size.

Key words: *Apis mellifera*, thymol, acute and chronic toxicity, letal and subletal effects, development, immunity, vitellogenin, Glutathione S-transferase, real-time PCR, enzymatic activity.

Dédicaces

A

mes chers parents et à mes sœurs pour leur soutien de tous les instants et pour la confiance et l'amour qu'ils me témoignent chaque jour.

A ma future épouse qui fait de ma vie un rêve.

A ma belle famille pour son soutien et son amour.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'accueil venin et activités biologiques à l'université Jean-François Champollion (site d'Albi) avec le soutien de la société d'APIREM France dans le cadre d'une convention CIFRE.

Je tiens à remercier l'équipe de Pierrick Aupinel ainsi que Dominique Fortini pour m'avoir bien accueilli dans leur laboratoire durant une semaine et de m'avoir formé à la technique d'élevage *in vitro*.

Je souhaite exprimer ici ma profonde gratitude et adresser mes sentiments à celles et à ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail.

Je remercie Angélique Vétillard et Claude Maranges de m'avoir confié ce travail de recherche et permis de finir cette thèse.

Je remercie particulièrement Anne et Bernard Remuaux de m'avoir permis de travailler en toute objectivité pendant ces trois années de thèse. Ces différents échanges et discussions scientifique ou apicole m'ont permis d'évoluer personnellement et professionnellement ainsi que de développer une nouvelle passion pour l'apiculture.

Je remercie Monique Gauthier d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mais aussi, Luc Belzunces, Frederic Delbac et Marc-Edouard Colin qui m'ont fait l'honneur de juger cette thèse.

Un grand merci à Jean-Luc Carayon et Sylvie Pardo de m'avoir accueilli chaleureusement chez eux durant les 6 mois de rédaction. Ces bons échanges se sont conclus par 6 kg supplémentaires merci pour tout !

Un grand merci à Natan Téné, Aline Rifflet et Jean-Luc Carayon pour leur aide, leur sympathie et leur accueil lors de mon arrivé et durant toute cette thèse.

Un grand merci à Jérémy Tabart de m'avoir soutenu durant toute la thèse ainsi que pour son aide et ses conseils précieux. Une personne qui mérite d'être connue et que l'on aimerait connaître mieux.

Un grand merci à cyril Vidau pour sa générosité, son aide et son amour pour la Provence.

Un grand merci à mes deux rayons de soleil pour leur soutien, leur aide et leur gentillesse et aussi d'avoir supporté mes odeurs de fumés sans rien dire ou presque et je me sens obligé de leur faire un joli et beau «soye ».

Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé à rédiger cette thèse, pour les relectures scrupuleuses et les corrections pertinentes.

Merci au groupe « c'est ça que c'est bon » pour toutes ces heures partagées, de travail, comme de détente.

Un grand merci à tout le service technique de l'université d'Albi qui font un travail formidable et rapide. Des gens compétents, gentils et disponibles.

Un grand merci à Pauline qui partage mes jours et mes nuits pour sa patience, son amour et son soutien.

Mes dernières pensées iront vers ma famille, et surtout mes parents, qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui.

Sommaire

RESUME.....	V
REMERCIEMENTS.....	VIII
SOMMAIRE.....	XI
TABLES DES ILLUSTRATIONS	XIV
I. TABLE DES FIGURES.....	XV
PRESENTATION GENERALE	18
INTRODUCTION	21
I. MODELE D'ETUDE : ABEILLE MELLIFERE	23
I.1. <i>Origine et taxonomie</i>	23
I.2. <i>Intérêt économique et écologique</i>	25
I.3. <i>La colonie</i>	29
I.4. <i>Développement</i>	37
II. LE DECLIN DES COLONIES	41
II.1. <i>Phénomène de déclin rapide</i>	41
II.2. <i>Phénomène de déclin lent</i>	42
III. LE THYMOL.....	49
III.1. <i>Structure chimique, famille de composé</i>	49
III.2. <i>Mode d'action</i>	50
III.3. <i>Métabolisme et toxicologie</i>	51
IV. METHODES D'ETUDE DE LA TOXICITE SUR LES ABEILLES	53
IV.1. <i>Méthodes d'étude de la toxicité aiguë</i>	54
IV.2. <i>Méthodes d'étude de la toxicité chronique</i>	55
IV.3. <i>Les effets sublétaux</i>	56
PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS SCIENTIFIQUES.....	59
MATERIELS ET METHODES	65
I. ÉLEVAGE LARVAIRE	67
I.1. <i>Choix de la méthode d'élevage</i>	67
I.2. <i>Obtention d'une ponte des reines sans interruption hivernale</i>	68
I.3. <i>Obtention de larves d'abeille au stade L1</i>	72
I.4. <i>Greffage</i>	73
I.5. <i>Élevage in vitro</i>	76

II.	CONTROLE DES CONDITIONS D'ELEVAGE LARVAIRE	82
II.1.	<i>Contrôle de la maîtrise de la technique de greffage</i>	82
II.2.	<i>Contrôle de la qualité du geste de greffage réalisé par le manipulateur.....</i>	82
III.	ÉTUDE DE LA TOXICITE DU THYMOL.....	85
III.1.	<i>Exposition au thymol.....</i>	85
IV.	ANALYSES STATISTIQUES	95
IV.1.	<i>Détermination de la toxicité aiguë et chronique du thymol.....</i>	96
IV.2.	<i>Détermination de la CL50 et de la DL50.....</i>	96
IV.3.	<i>Détermination du nombre d'individus à prélever pour la mesure des effets sublétaux du thymol</i>	96
IV.4.	<i>Détermination de l'effet du thymol sur la croissance pondérale</i>	96
IV.5.	<i>Détermination de l'effet du thymol sur l'expression génique et l'activité enzymatique.....</i>	97
RESULTATS		99
I.	CONTROLE DES CONDITIONS D'ELEVAGE LARVAIRE.....	101
I.1.	<i>Contrôle de l'hygrométrie dans les caissons d'élevage.....</i>	101
I.1.	<i>Contrôle du niveau de contamination de la nourriture larvaire</i>	102
I.1.	<i>Contrôle de la maîtrise de la technique de greffage.....</i>	102
II.	ÉTUDE DES EFFETS LETAUX DU THYMOL SUR LE DEVELOPPEMENT DES LARVES D'ABEILLES	104
II.1.	<i>Toxicité aiguë et chronique du thymol sur les larves exposées via la cire.....</i>	104
II.2.	<i>Toxicité aiguë et chronique du thymol sur les larves exposées via la nourriture larvaire</i>	105
II.3.	<i>CL50 et DL 50 aiguë et chronique du thymol</i>	107
III.	ANALYSE DES EFFETS SUBLETAUX DU THYMOL SUR LE DEVELOPPEMENT DES LARVES D'ABEILLES	107
III.1.	<i>Effet du thymol sur la croissance pondérale des larves</i>	108
III.2.	<i>Effet du thymol sur l'expression des gènes</i>	109
III.3.	<i>Effet du thymol sur l'expression des gènes marqueurs de l'immunité et sur l'expression de la vitellogénine, marqueur du développement.....</i>	111
III.4.	<i>Effet du thymol sur l'activité enzymatique.....</i>	122
III.5.	<i>Effet du thymol sur l'activité du lysozyme.....</i>	124
III.6.	<i>Effet du thymol sur l'activité de la glucose déshydrogénase</i>	126
III.7.	<i>Effet du thymol sur l'activité de la glutathion S-Transférase</i>	128
DISCUSSION		131
I.	ÉLEVAGE <i>IN VITRO</i>	CXXXIII
II.	ANALYSES DES EFFETS LETAUX DU THYMOL	CXXXIV
III.	ANALYSES DES EFFETS SUBLETAUX DU THYMOL	CXXXVII
IV.	ÉTUDE DU RISQUE ENCOURU PAR LES ABEILLES AU COURS DE LEUR DEVELOPPEMENT LARVAIRE DU AUX RESIDUS DE THYMOL PRESENTS DANS LA CIRE ET LA NOURRITURE	145
V.	CONCLUSION	146
PERSPECTIVES		147
ABRÉVIATIONS		155

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159
ANNEXES	179

Table des illustrations

Tableau 1 : Impact économique des insectes pollinisateurs et vulnérabilité des régions géographiques (Gallai et al., 2009).....	28
Tableau 2 : Impact économique des insectes pollinisateurs et vulnérabilité des récoltes de chaque culture (Gallai et al., 2009).	29
Tableau 3 : Nourriture distribuée par les abeilles nourrices au couvain d'ouvrières (Sammataro & Avitabile, 1998).....	38
Tableau 5 : Temps de développement moyen des trois castes d'abeilles (Donzé, 1995 ; Rembold et al., 1980 ; Winston, 1993 ; Jay, 1964).	40
Tableau 6 : Récapitulatif des résidus de thymol retrouvé dans la cire et le miel après traitement des ruches.....	48
Tableau 7 : Composition des aliments A, B et C successivement distribués aux larves au cours de leur élevage in vitro (Aupinel et al., 2005).	78
Tableau 8 : Séquences des amorces employées pour l'amplification des fragments des gènes d'intérêt et des gènes de référence.....	91
Tableau 9 : Hygrométrie mesurée dans les caissons en fonction du temps.....	101
Tableau 10 : Hygrométrie mesurée dans les caissons en fonction du temps.....	102
Tableau 11 : Mortalité des larves d'abeilles élevées in vitro (A) Pourcentage de larves mortes parmi 48 greffées dans des cupules en plastique ou en cire disposées dans un dispositif d'élevage. (B) Pourcentage de larves mortes au cours de l'élevage d'individus greffés dans 6 dispositifs d'élevage selon la méthode originelle. (C) Pourcentage de larves mortes au cours de l'élevage d'individus greffés dans 6 dispositifs d'élevage selon la méthode développée dans cette étude.....	103
Tableau 12 : Concentration en thymol induisant 50 % de mortalité larvaire (CL50) et la dose en thymol induisant 50% de mortalité larvaire (DL50) à la fin de la consommation du premier aliment et à la fin du nourrissage Les concentrations en thymol sont exprimées en milligrammes par kilogramme d'aliment ou de cire respectivement. Les doses sont exprimées en µg de thymol.	107

I. TABLE DES FIGURES

Figure 1 : La taxonomie de l'ordre des hyménoptères modifiée (Sing-yi-feng & Colin Goto, 2008).	23
Figure 2 : Aires de répartition des espèces du genre <i>Apis</i> d'après Ruttner, 1988.	24
Figure 3 : Évolution de la population d'abeilles et de la ponte de la reine durant l'année 1984 à Liebfeld (Imdorf et al., 1996b).	30
Figure 4 : Abeilles ouvrières sur un cadre de couvain ouvert rempli d'œufs et de larves.	31
Figure 5 : Les glandes hypopharyngiennes (en bas à droite) et salivaires (en haut à gauche) d'une abeille ouvrière.	32
Figure 6 : Paillettes de cire produites par les glandes cirières chez l'abeille maçon.	32
Figure 7 : Travaux effectués durant la vie d'une ouvrière (Le conte, 2002).	35
Figure 8 : Faux bourdons (encerclés) et ouvrières sur un cadre de couvain operculé.	36
Figure 9 : Une reine d'abeilles.	37
Figure 10: Diagramme des différents stades de développement en fonction de l'âge de l'ouvrière en jour L1, L2, L3, L4 et L5 = stades larvaires 1, 2, 3, 4 et 5 ; LS = redressement de la larve qui tisse le cocon ; PP = immobilisation de la larve après tissage du cocon ou prénymphe ; Pw = Nymphe aux yeux blancs ; Pp = Nymphe aux yeux roses ; Pr = Nymphe aux yeux rouges marrons ; Pd = Nymphe aux yeux marrons foncés ; Pdl = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule claire ; Pdm = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule de couleur intermédiaire ; Pdd = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule foncée ; ADU = Ouvrière adulte ou imago. (Jay, 1962 ; Rembold et al., 1980 ; Colin, communication personnelle).	39
Figure 11 : Structure chimique de l'Amitraze.	46
Figure 12 : Structure chimique de la Tau-Fluvalinate.	47
Figure 13 : Les différentes molécules présentant une structure proche du thymol.	50
Figure 14 : Équilibre formé pour la synthèse de différents neurotransmetteurs à partir de la tyrosine (Barron, 2010).	51
Figure 15 : Évolution de la ponte de la reine à Liebfeld (Imdorf et al., 1996b).	69
Figure 16 : Rucher fermé vu de l'extérieur au début de sa mise en place Au centre du carré jaune à gauche, se trouve la sortie de la première ruche installée. Au centre du losange blanc à droite celle de la deuxième ruche.	70
Figure 17 : Rucher fermé vu de l'intérieur au début de sa mise en place. Une première ruche est installée et un premier convecteur électrique est en place. Devant ce convecteur, une cage à reine et une valise destinée aux transports des cadres entre le rucher couvert et le laboratoire sont prêts à être utilisés.	70
Figure 18 : Mécanisme permettant aux abeilles d'entrer et de sortir de la ruche sans que le vent ne puisse y entrer.	71
Figure 19 : Représentation schématique des adaptations réalisées sur le couvre cadre (vue de dessus) afin de le rendre compatible avec son utilisation dans le rucher couvert.	72
Figure 20 : Cadre de couvain extrait d'une cage à reine.	72
Figure 21 : Dispositif d'encagement de la reine. Les cadres de couvain portant de jeunes larves sont placés de part et d'autre de la cage de manière à maintenir les nourrices proches de la reine favorisant ainsi la ponte. Les cadres de réserves sont placés à proximité des cadres de couvain afin de faciliter aux nourrices la procuration de miel et du pollen pour la production de nourriture larvaire.	73
Figure 22 : Matériels de greffage. 1 : Source de lumière froide, 2 : cadre de couvain, 3 : support de cadre, 4 : loupe binoculaire, 5 : dispositif d'élevage, 6 : pissette contenant de l'éthanol à 70°, 7 : picking chinois.	74

Figure 23 : Plan de greffage des larves disposées sur le dispositif d'élevage verticalement pour avoir une répartition homogène des larves dans chaque traitement. La flèche désigne le sens du greffage.	76
Figure 24 : Dispositif d'élevage des larves in vitro (Aupinel et al., 2005).	76
Figure 25 : Cupule en plastique Nicot.	77
Figure 26 : Cupule en cire fabriquée au laboratoire.	77
Figure 27 : Quantité d'aliment A, B et C distribuée successivement aux larves élevées in vitro et chronologie des nourrissages en lien avec les principales étapes de l'élevage.	78
Figure 28 : Étuve ventilée thermostatée à 34°C contenant les caissons d'élevage en Plexiglass® hermétique.	79
Figure 29 : Dispositifs d'élevage contenant les cupules en plastique et en cire accueillant les larves : (A) Larves 4 jours après greffage ; (B) Larves 5 jours après greffage ; (C) Larves 6 jours après greffage. Les flèches blanches désignent les quelques larves qui commencent à se redresser.	80
Figure 30 : Larve d'abeille en conditions d'élevage sans traitement présentant des nécroses (tâches noires) 5 jours après greffage.	81
Figure 31 : Larves d'abeille au stade nymphal en conditions normales d'élevage présentant des nécroses et des malformations. (A) A gauche : nymphe aux yeux blancs dont les pattes, désignées par une flèche blanche, sont individualisées ; à droite : nymphe aux yeux blancs pour laquelle la formation des pattes vient juste de débiter. (B) Nymphe aux yeux marrons foncés ne présentant pas un développement normal des pattes, mais avec une pigmentation normale des yeux (flèches blanches).	81
Figure 32 : Carte du plasmide pGEM®-T EasyVector (Promega).	92
Figure 33 : Effet du thymol sur la survie des larves d'abeilles élevées in vitro dans des cupules en cire contaminée avec du thymol. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.	105
Figure 34 : Effet du thymol sur la survie des larves d'abeilles élevées in vitro dans des cupules en plastiques	106
Figure 35 : Évolution du poids des larves témoins manipulation élevées dans des conditions contrôlées jusqu'au dixième jour de développement.	108
Figure 36 : Poids des larves d'abeilles à la fin du stade larvaire lorsque celles-ci ont été élevées in vitro dans différentes conditions. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.	109
Figure 37 : Effet du thymol sur le nombre de transcrits de l'actine en log base 2 au cours du développement larvaire (A) Un jour; (B) 6 jours; (C) 8 jours (D) et 10 jours après greffage.	110
Figure 38 : Effet du thymol sur le nombre de transcrits de la protéine ribosomiale 49 en log base 2 au cours du développement larvaire. (A) un jour ; (B) 6 jours ; (C) 8 jours ; (D) 10 jours après greffage.	110
Figure 39 : Expression normalisée de l'abaecine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.	112
Figure 40 : Diagramme de l'expression normalisée de l'abaecine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (***) $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).	113
Figure 41 : Expression normalisée du lysozyme au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.	114
Figure 42 : Diagramme de l'expression normalisée du lysozyme au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (***) $P < 0,001$; * $P < 0,05$).	115
Figure 43 : Expression normalisée de la prophénol oxydase au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.	116

Figure 44 : Diagramme de l'expression normalisée de la phénol oxydase au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (** $P < 0,001$; * $P < 0,05$). _____	117
Figure 45 : Expression normalisée de la protéase à sérine 14 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. _____	118
Figure 46 : Diagramme de l'expression normalisée de la protéase à sérine 14 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. _____	118
Figure 47 : Expression normalisée de la serpine 5 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. _____	119
Figure 48 : Diagramme de l'expression normalisée de la serpine 5 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). _____	120
Figure 49 : Expression normalisée de la vitellogénine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. _____	121
Figure 50 : Diagramme de l'expression normalisée de la vitellogénine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$). _____	122
Figure 51 : Activité de la phénol oxydase exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. _____	123
Figure 52 : Diagramme du niveau d'activité relative de la phénol oxydase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. _____	124
Figure 53 : Activité du lysozyme exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. _____	125
Figure 54 : Diagramme du niveau d'activité relative du lysozyme au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activités significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (** $P < 0,01$). _____	126
Figure 55 : Activité de la glucose deshydrogénase exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines totales au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. _____	127
Figure 56 : Diagramme du niveau d'activité relative de la glucose deshydrogénase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activités significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (** $P < 0,01$). _____	128
Figure 57 : Activité de la glutathion S transférase exprimée en unités relatives à la quantité de protéines totales au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. _____	129
Figure 58 : Diagramme du niveau d'activité relative de la glutathion S transférase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activité significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (** $P < 0,01$). _____	129
Figure 59 : Schéma récapitulatif des principaux résultats de cette étude réalisée d'après le dessin du développement de l'abeille par Adam Tofilski (www.honeybee.drawwing.org). _____	cxliii

PRESENTATION GENERALE

L'abeille est essentielle à la vie sur Terre et constitue un modèle privilégié pour les scientifiques : son étude permet de répondre à de nombreuses questions d'intérêt général, mais également de mieux connaître la contribution de cet insecte sur le plan écologique et économique.

L'abeille présente en effet un intérêt économique indéniable : nous pensons bien évidemment aux produits de la ruche, mais aussi et surtout à son rôle fondamental dans la pollinisation et, par conséquent, dans la survie des cultures. On estime à environ 20 000, le nombre de végétaux dont la pérennité dépend de la pollinisation des abeilles. Parmi ces végétaux, il y aurait 40% de plantes cultivées telles que les fruits, les légumes et les oléagineux, ce qui représenterait, au niveau européen, 84% des espèces cultivées tributaires des pollinisateurs, parmi lesquels les abeilles sauvages et domestiques comptent pour plus de 90%. L'abeille est également une clef écologique essentielle et sa disparition entraînerait de graves problèmes pour la nature et, en cascade, pour l'espèce humaine. Dans ce contexte, la conservation de l'abeille compte dans les préoccupations majeures de l'Homme. Or depuis une quinzaine d'années, les colonies d'abeilles subissent une véritable hécatombe dans le monde entier. En France, l'interdiction en 2006 du Gaucho (Bayer) et du Régent (BASF), deux insecticides mis en avant dans le ravage des colonies d'abeilles, n'a pas empêché la poursuite de l'hécatombe au sein des cheptels. La cause reste inconnue à ce jour mais elle est probablement multicausales. De nombreux apiculteurs soupçonnent les pesticides, toujours fortement utilisés en agriculture, comme étant à l'origine de ce qu'on désigne désormais par le « syndrome d'effondrement des colonies ». L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments (AFSSA), encore dénommée comme telle à l'époque, avait révélé une enquête rendue publique en 2008 qui soulignait des causes multicausales de la surmortalité des abeilles, telles que le problème de biodiversité lié au manque de pollen, les agents chimiques ou encore biologiques. Parmi les agents biologiques, le parasite *Varroa destructor* a été qualifié « d'ennemi numéro un » dans le rapport du député Saddier. Cet acarien est sans aucun doute le parasite le plus dévastateur de l'abeille européenne *Apis mellifera* à deux titres : en parasitant et affaiblissant cette dernière à tous les stades de son développement mais également en engendrant une utilisation de produits chimiques pour lutter contre les infestations massives de ce parasite. Les apiculteurs ont ainsi recours à toute une batterie d'acaricides tels que l'amitraz, le coumaphos ou le fluvalinate. Leur utilisation a non seulement conduit à une baisse d'efficacité par le développement de résistances, mais surtout ces molécules chimiques s'accumulent dans les produits de la ruche (miel, cire, pollen) entraînant des répercussions sur la santé de l'abeille. Les abeilles sont en effet toxico-sensibles et plus vulnérables que bon nombre d'autres insectes aux polluants chimiques. Ceci s'explique par un système de détoxification moins élaboré que celui de la mouche drosophile par exemple, laquelle résistera de fait plutôt bien aux produits chimiques que sont les insecticides et acaricides. C'est ainsi que les produits dits naturels semblent être une alternative à la chimie. Parmi eux, le thymol, acaricide neurotoxique est largement utilisé dans le monde sous différentes

formulations (Apiguard[®], Thymovar[®] and ApilifeVAR[®]) pour lutter contre la varroose. Le thymol est introduit près des cadres de couvain lors du pic d'infestation, qui coïncide dans les régions tempérées au développement du couvain, lequel assure la descendance de la colonie durant l'hiver et donc sa longévité. Il est donc crucial de s'assurer de l'absence de nocivité du thymol pour la colonie et particulièrement pour le couvain.

Face à de récentes données inquiétantes suggérant que le thymol aurait des effets perturbateurs sur l'abeille adulte et des propriétés larvicides sur le couvain d'abeille, des travaux restaient à mener pour investiguer plus finement les effets du thymol sur le développement du couvain d'abeilles. C'est à cette tâche que notre recherche doctorale vise à contribuer.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes tout d'abord intéressés à une étude de toxicité du thymol *via* la contamination dans la cire et dans la nourriture ; pour l'étude des effets létaux et sublétaux, nous avons considéré les expériences d'intoxication uniquement *via* la nourriture sur des larves élevées *in vitro*. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la toxicité aiguë du thymol et, dans un second temps, à la toxicité chronique par l'analyse de son éventuel effet sur l'expression de gènes ainsi que sur l'activité enzymatique de protéines impliquées dans le système immunitaire de l'abeille, le système de détoxification ainsi que dans le développement des larves et des nymphes, stades considérés comme particulièrement sensibles.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une revue bibliographique afin d'avoir une vue d'ensemble sur la société des abeilles, leur importance économique et écologique et sur les connaissances actuelles concernant le thymol. Une problématique incluant les objectifs de cette thèse terminera ce chapitre.

INTRODUCTION



I. MODELE D'ETUDE : ABEILLE MELLIFERE

I.1. Origine et taxonomie

Il y a environ cent millions d'années, au cours du Crétacé, les premières plantes à fleurs (Angiospermes) apparaissent sur terre en procurant un apport de protéines et de glucides au règne animal. C'est probablement au même moment qu'ont émergé les insectes pollinisateurs. Ils ont résisté aux différents changements climatiques et ont co-évolué ensemble pour aboutir aujourd'hui à 250 000 espèces d'Angiospermes et 20 000 espèces d'insectes pollinisateurs dont les abeilles. Les deux plus anciens fossiles d'abeilles constitués d'ambre ont été retrouvés aux États-Unis et dans la mer baltique et sont datés de cinquante à quatre-vingt-seize millions d'années. L'abeille mellifère, quant à elle, est beaucoup plus récente. Sa présence remonte en effet à environ 2 millions d'années (ADAM Frère, Les croisements et l'apiculture de demain).

L'abeille est un insecte de l'ordre des hyménoptères qui compte environ 198 000 espèces, elle fait partie de la superfamille des *Apoidea* qui comporte 20 000 espèces dont 2 500 en Europe et 1 000 en France (Michener, 2007 ; Rasmont et *al.*, 1995). Dans cette famille, on retrouve les abeilles au sens large qui présentent une cuticule poilue dotée d'un appareil de récolte du pollen sur les pattes postérieures et une langue développée pour la consommation de nectar.

La famille des *Apidae* contient plusieurs sous-familles dont celle des *Apinae* qui comporte des espèces sociales comme les abeilles des orchidées, les bourdons, les abeilles sans dard. Le genre *Apis* contient quatre espèces qui sont : *mellifera* ou *linaeus*, *cerana*, *dorsata* et *floreana* (Figure 1).



Figure 1 : La taxonomie de l'ordre des hyménoptères modifiée (Sing-yi-feng & Colin Goto, 2008).

L'espèce la plus productive et la plus utilisée en apiculture est *Apis mellifera* Linné. Elle est présente naturellement en Europe, en Afrique et en Asie occidentale ; elle a été introduite par l'Homme en Amérique et en Océanie. Les autres espèces se retrouvent surtout en Asie et en Inde (Figure 2). Parmi ces espèces, la plus proche de l'abeille européenne est *Apis cerana* qui s'élève également bien en ruche.



Figure 2 : Aires de répartition des espèces du genre *Apis* d'après Ruttner, 1988.

L'espèce *Apis mellifera* Linné se décline en vingt sous-espèces interfécondes qui ont évolué dans des écosystèmes différents à cause notamment de contraintes géographiques telles que les montagnes (Ruttner, 1988 ; Miguel et *al.*, 2007). Les quatre principales sous-espèces de l'Europe occidentale sont : *Apis mellifera mellifera*, appelée aussi « abeille noire commune ». Elle peuple l'Europe occidentale et septentrionale. *Apis mellifera ligustica*, appelée « abeille italienne », est présente en Italie et séparée d'*Apis mellifera mellifera* par la chaîne montagneuse des Alpes. *Apis mellifera carnica* est une sous-espèce originaire d'Autriche peuplant le Sud-Est de l'Europe et est séparée d'*Apis mellifera mellifera* par les chaînes de montagnes des Balkans. Enfin, *Apis mellifera caucasica*, originaire du Caucase présente une zone de transition avec *Apis mellifera mellifera* dans l'Europe de l'Est.

Depuis des décennies, les apiculteurs s'échangent des essaims et réalisent des croisements entre les différentes espèces, ce qui a contribué à augmenter la diversité génétique des sous-espèces (Harpur et *al.*, 2012). Par contre, il est maintenant difficile de parler de sous-espèces pures et certaines sous-espèces comme la buckfast (majoritairement *ligustica*), une abeille douce et productrice appréciée des apiculteurs, sont apparues au début du XX^{ème} siècle suite à de nombreux croisements.

I.2. Intérêt économique et écologique

I.2.1 Les produits apicoles

En 2010, la filière apicole a produit un chiffre d'affaires de cent dix-sept millions d'euros d'après l'établissement national des produits de l'agriculture et de la mer (FranceAgriMer). Tous les produits fabriqués par l'abeille sont valorisés et utilisés par l'homme pour sa consommation, son bien-être et sa santé. Par exemple, la gelée royale est utilisée dans des crèmes de haute qualité pour diminuer les rides, le venin d'abeille calme la douleur de certaines maladies, la propolis mélangée à l'alcool est utilisée comme solution désinfectante et le pollen comme complément alimentaire. En France, les productions apicoles sont faibles et, par voie de conséquence, la demande est couverte, à 95 %, par les importations.

I.2.1.1 Le miel

La fabrication du miel débute dans le jabot de la butineuse par la transformation du nectar des plantes ou du miellat des insectes sous l'action de ferments et d'enzymes présents dans le tube digestif. Le saccharose du nectar va ainsi se transformer en différents sucres dont le glucose, le fructose. De retour à la ruche, la butineuse va transférer par trophallaxie sa récolte aux abeilles gestionnaires qui, par régurgitations successives d'une abeille à une autre, vont terminer la transformation amorcée, avant d'aller dégorger dans les alvéoles de cire encore disponibles. Lors de ce processus, la teneur en eau s'amenuise et parallèlement le liquide s'enrichit en sucres gastriques et en substances salivaires. La chaleur de la ruche et la ventilation par les abeilles vont aboutir à une concentration de la solution sucrée obtenue d'environ 80% de sucre pour un peu moins de 18% d'eau en l'espace de cinq jours (Clément, 2002). L'operculation de l'alvéole remplie de miel permet le stockage des réserves de nourriture hivernale pour la colonie, le surplus de miel étant placé dans les hausses et récolté par l'apiculteur. En 2010, 20 000 tonnes de miel ont été récoltées d'après l'établissement national des produits de l'agriculture et de la mer (AgriMer). Aux Etats Unis, bien que les colonies d'abeilles soient surtout utilisées pour la pollinisation des plantes agricoles, la production de miel par ruche a cependant augmenté entre les années 1961 à 2008 d'après l'analyse de la Food and agriculture organization (FAO). Le miel est très utilisé en agroalimentaire, pour son pouvoir édulcorant ; il peut se conserver longtemps grâce à sa faible teneur en eau et sa forte pression osmotique.

I.2.1.2 L'hydromel

L'hydromel est un produit dérivé du miel. Il est souvent appelé vin de miel. C'est une boisson alcoolisée fabriquée à partir de miel, d'eau et de levures. Certains producteurs font varier son goût par l'ajout de fruits ou d'épices.

1.2.1.3 Le pollen

Le pollen est la semence mâle produite par les étamines des fleurs. Les abeilles ont recours au pollen comme source de protéines. Elles le récoltent sur leurs pattes postérieures en butinant les fleurs. Il est constitué principalement de 20% de protéines, de 35% de glucides et de 5% de lipides, ainsi que de minéraux et de vitamines. Les abeilles le consomment toute l'année et font des stocks pour l'hiver. Le pollen est également récolté par les apiculteurs à l'aide de trappes à pollen. Il est utilisé en agroalimentaire comme complément alimentaire pour son taux de protéines. Une ruche peut récolter 100 kg de pollen par an (Sammataro & Avitabile, 1998).

1.2.1.4 La gelée royale

La gelée royale est produite par les ouvrières grâce à un système de sécrétion glandulairecéphalique (glandes hypopharyngiennes et glandes mandibulaires) et a pour fonction de nourrir toutes les larves de leur éclosion jusqu'au troisième jour, les larves destinées à devenir reines jusqu'au cinquième jour après l'éclosion et de la reine pendant toute la durée de son existence. Cette substance très nutritive va permettre aux larves de multiplier leur poids par 1500 en environ 6 jours. La gelée royale est constituée de 66% d'eau, de 14% de glucides, de 13% de protéines, de 5% de lipides, d'oligoéléments, et de vitamines. Elle contient des protéines importantes impliquées dans la conservation (propriétés antimicrobiennes) et la multiplication cellulaire. Les apiculteurs augmentent leur production en stimulant l'élevage des reines par les ouvrières. Pour ce faire, ils divisent la ruche en deux avec une grille à reine. Dans la partie sans reine, les ouvrières élèvent donc de nouvelles reines et dépose de grandes quantités de gelée royale dans les cellules royales. La récolte est effectuée manuellement avec une pompe reliée à un capillaire. En 2010, 2 tonnes de gelée royale ont ainsi été récoltées (source AgriMer).

1.2.1.5 La cire

La cire sert à bâtir les alvéoles qui constituent le support de tous les produits de la ruche tels que le miel, le pollen et le couvain. La cire est fabriquée par les ouvrières grâce à des glandes cirières et est composée principalement de différentes molécules lipophiles (des esters 68%, des alcanes 14% et des acides gras libres 12%). La cire est vendue par les apiculteurs pour produire des bougies et des cires à meuble.

1.2.1.6 La propolis

La propolis est une substance collante aussi appelée « colle d'abeille ». Elle est récoltée par les abeilles sur les plantes qui protègent leurs bourgeons par une fine pellicule résineuse. Soixante-sept spécimens de plantes sont visités par les abeilles ramassant de la propolis, la plus grande partie de la

propolis provient du peuplier, du prunier et du bouleau (Crane et *al.*, 1990). La propolis possède des propriétés antimicrobiennes, antivirales et antifongiques. Les abeilles l'utilisent pour colmater les fissures et assainir la ruche. Elle est utilisée pour fabriquer des vernis pour le bois, des pommades et autres produits de santé. Pour la récolter, les apiculteurs déposent un grillage avec de petites mailles souvent en plastique qui seront bouchées avec de la propolis par les abeilles.

I.2.1.7 Le venin

Le venin ou apitoxine est utilisé par les abeilles pour se défendre contre les prédateurs de la ruche. La piqûre d'abeille est douloureuse et peut provoquer des réactions toxiques voir des chocs anaphylactiques résultant d'une réaction allergique. Le venin est connu pour avoir des propriétés antalgiques. Il présente notamment un intérêt thérapeutique dans le traitement des douleurs causées par l'arthrite et l'athérosclérose (Lee et *al.*, 2010). Les apiculteurs peuvent recueillir le venin en stimulant les ouvrières avec un faible courant électrique produisant la sortie du venin sans les tuer.

I.2.2 La pollinisation des plantes et des cultures par les abeilles

En plus de l'importance des produits de la ruche, les abeilles et de manière plus générale les insectes pollinisateurs ont un rôle écologique de premier plan en réalisant la reproduction des plantes entomophiles et en favorisant le maintien de leur diversité (Ashman et *al.*, 2004 ; Aguilar et *al.*, 2006).

L'abeille joue un rôle économique important car 35% de la production agricole dépend des pollinisateurs et la pollinisation des plantes par l'abeille augmente les rendements agricoles (Klein et *al.*, 2007 ; Ricketts et *al.*, 2008). La pollinisation est à l'origine d'un chiffre d'affaires d'environ deux milliards d'euros, soit un montant dix fois supérieur à celui de la production apicole d'après les premières études de l'Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et de la Pollinisation (ITSAP).

Le déclin des abeilles induirait une perte économique mondiale estimée à 153 milliards d'euros (Tableau 1) et les cultures les plus touchées seraient celles de café, de cacao, de noixettes et de fruits (Tableau 2) (Gallai et *al.*, 2009). L'effet sur l'alimentation humaine serait ainsi considérable car 74% de la production globale de lipides est produite à partir de plantes pollinisées et 98% des vitamines solubles sont obtenues à partir de fruits et de plantes pollinisées (Eilers et *al.*, 2011).

Tableau 1 : Impact économique des insectes pollinisateurs et vulnérabilité des régions géographiques (Gallai et al., 2009)

Région géographique	Valeur économique agricole (10 ⁹ Euros)	Valeur économique des insectes pollinisateurs (10 ⁹ Euros)	Vulnérabilité des régions en %
<u>Afrique</u>	137,5	11,9	8
Afrique du Centre	10,1	0,7	7
Afrique de l'Est	19,6	0,9	5
Afrique du Nord	39,7	4,2	11
Afrique du Sud	19,2	1,1	6
Afrique de l'Ouest	48,9	5,0	10
<u>Asie</u>	899,8	89,4	10
Asie du Centre	11,8	1,7	14
Asie de l'Est	418,4	51,5	12
Asie du centre Est	63,5	9,3	15
Océanie	18,8	1,3	7
Asie du Sud	219,4	14,0	6
Asie du Sud Est	167,9	11,6	7
<u>Europe</u>	216,7	22,0	11
Union Européenne	148,9	14,2	10
Non EU	67,8	7,8	12
<u>Amérique du Nord</u>	125,7	14,4	11
<u>Amérique du Sud et du Centre</u>	238,8	15,1	6
Amérique du Centre et Caraïbe	51,1	3,5	7
Amérique du Sud	187,7	11,6	6

Il apparaît que toutes les régions voient leur valeur économique agricole dépendre des insectes pollinisateurs. Ces régions sont plus ou moins vulnérables au manque d'abeilles, par exemple : l'Afrique de l'Est a seulement 5% de sa production agricole liée à la pollinisation alors que ce chiffre est de 15% pour l'Asie du Centre Est (Gallai et al., 2009). Ce chiffre de vulnérabilité diffère en fonction des cultures présentes (Tableau 2).

Tableau 2 : Impact économique des insectes pollinisateurs et vulnérabilité des récoltes de chaque culture (Gallai et al., 2009).

Types de cultures	Valeur économique agricole (VEA) (10 ⁹ Euros)	Valeur économique des insectes pollinisateurs (VEIP) (10 ⁹ Euros)	Vulnérabilité des productions (VEIP/VEA) en %
Plantes (thé, café, cacao)	19	7	37
Noisettes	13	4,2	31
Fruits	219	50,6	23,1
Oléagineux comestibles	240	39	16,3
Légumes	418	50,9	12,2
Légumes à gousse	24	1	4,3
Épices	7	0,2	2,7
Céréales	312	0	0
Cultures sucrières	268	0	0
Racines et tubercules	98	0	0

I.3. La colonie

Une colonie comporte entre 10 000 et 60 000 ouvrières, entre 0 et 6 000 faux-bourçons et une seule reine. Cette population varie en fonction de différents facteurs tels que le climat, la sous-espèce des abeilles et la quantité de ponte de la reine (Martin et al., 2001). Toutes les castes d'abeilles (ouvrière, mâle, reine) sont nécessaires au bon développement de la colonie (Alberti & Hänel, 1986 ; Martin et al., 2001). Dans les pays tempérés, la population d'abeilles atteint son maximum à la fin du printemps ou au début de l'été et son minimum pendant la saison hivernale (d'octobre à mars). Durant la période d'hivernage de la ruche, seules de petites surfaces de couvain sont pondues et les arrêts de ponte sont fréquents (Figure 3) (Imdorf et al., 1996b).

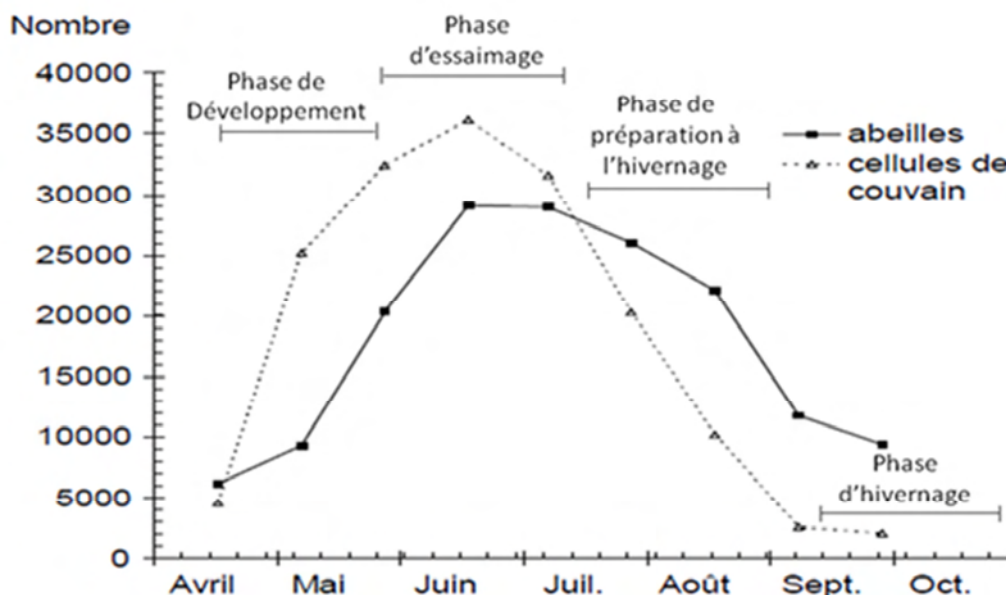


Figure 3 : Évolution de la population d'abeilles et de la ponte de la reine durant l'année 1984 à Liebfeld (Imdorf et *al.*, 1996b).

Durant la période favorable (de mi-avril à mi-juillet), il arrive que la population d'abeilles soit trop importante pour une colonie et que la nourriture soit en excès, un phénomène naturel de division de la colonie, appelé essaimage, se produit alors. La reine quitte la ruche avec une partie des ouvrières et des réserves. Cet essaim va rapidement se mettre en grappe sur un support provisoire avant de trouver un endroit définitif pour former une nouvelle colonie. Dans la ruche restante, une première reine va naître des cellules royales produites par les ouvrières et tuer toutes les autres. Après 7 jours de développement, ses organes sexuels sont matures, elle effectue alors un vol durant lequel elle va s'accoupler avec plusieurs mâles et revient à la ruche pour remplir sa fonction de reine.

L'abeille est un insecte social, chaque caste a donc un rôle précis pour le bon fonctionnement de la ruche. La reine pond des œufs afin de produire des ouvrières pour maintenir une activité de travail dans la ruche et assurer ainsi le développement de la colonie, des mâles pour la reproduction des nouvelles reines, et une à trois fois par an des reines pour la multiplication des colonies afin que l'espèce perdure.

I.3.1 L'ouvrière

Les ouvrières (Figure 4) réalisent tous les travaux de la ruche suivant les saisons, les circonstances et le développement de leurs glandes. Le poids des ouvrières varie fortement en fonction de la race, du nombre, de l'âge des nourrices et de la disponibilité de nourriture. Elles pèsent entre 81 et 152 mg (Winston, 1993). Leur durée de vie dépendante de la saison (Fluri, 1994), semble influencée par le temps de vol et par l'activité de nourrice (Neukirch, 1982 ; Smedal et *al.*, 2009). Ainsi, durant la période d'activité de mai à septembre, les abeilles ont un temps de vie moyen de 15 à 30 jours avec un

maximum enregistré de 70 jours. Durant l'hiver, les ouvrières ont un temps de vie beaucoup plus long pouvant aller jusqu'à 8 mois (243 jours) (Fluri, 1994).

Dès leur naissance, les ouvrières réalisent une série de tâches dont la séquence est une partie intégrante de l'organisation sociale de la colonie.



Figure 4 : Abeilles ouvrières sur un cadre de couvain ouvert rempli d'œufs et de larves.

1.3.1.1 L'imago (abeille naissante)

Lors de son émergence l'imago présente une cuticule molle. Il faudra entre 12 et 24 heures pour que celle-ci sèche et durcisse.

1.3.1.2 Nettoyeuse

Une fois la cuticule durcie, l'ouvrière effectue ses premiers travaux de nettoyeuse. Sa tâche consiste à enlever les débris de cire, les morceaux de pollen et les fèces laissés par les nymphes écloses, puis à lécher et à polir le fond de la cellule. Les alvéoles ainsi préparées serviront soit à élever une abeille, soit à stocker des réserves de miel ou de pollen.

1.3.1.3 Nourrice

Les glandes impliquées dans la fabrication de gelée royale se développent dès les premiers jours de vie de l'abeille. Au bout de trois jours, les nourrices sont capables de nourrir des larves grâce à leurs glandes mandibulaires et à leurs glandes hypopharyngiennes qui produisent respectivement une sécrétion blanche riche en lipides et une substance riche en protéines (Figure 5). Elles permettent la production de gelée royale qui est déposée au fond de la cupule proche de la larve grâce à l'ouverture des mandibules de la nourrice (Huang, 1990).



Figure 5 : Les glandes hypopharyngiennes (en bas à droite) et salivaires (en haut à gauche) d'une abeille ouvrière.

Les nourrices vont consommer une grande quantité de pollen pour stimuler leurs glandes et fournir aux larves la quantité nécessaire de nourriture (Rortais et *al.*, 2005 ; Frazier, 2009).

1.3.1.4 Maçonne

Quinze jours après l'émergence, les glandes mandibulaires de l'ouvrière sont atrophiées. Au contraire, les glandes cirières sont arrivées à maturité et produisent de petites écailles de cire qui seront mélangées à de la salive par l'abeille maçonne et seront employées à la construction de nouvelles alvéoles (Figure 6).



Figure 6 : Paillettes de cire produites par les glandes cirières chez l'abeille maçonne.

1.3.1.5 Gestionnaire

Chez l'abeille gestionnaire les glandes cirières sont atrophiées. Sa tâche est de récupérer le nectar des butineuses par trophallaxie à l'entrée de la ruche, de le régurgiter et de l'ingurgiter à plusieurs reprises dans le but de le déshydrater. Quand le nectar atteint une teneur en eau de 18%, il est stocké dans une alvéole. Il est alors appelé miel. Pour le pollen, c'est la butineuse qui le dépose dans une alvéole et c'est la gestionnaire qui le mélange avec du miel. Elle rajoute des enzymes comme l'invertase, l'amylase, la gluco-oxydase. Produites par les glandes salivaires de l'abeille, elles permettent l'hydrolyse des glucides et une action bactéricide pour une longue conservation du miel et du pollen (Tautz, 2008).

1.3.1.6 Ventileuse

L'abeille ventileuse est âgée d'environ 18 jours et a pour tâche de réguler la température de la ruche et de maintenir le couvain à une température comprise entre 30 et 37°C (Fahrenholz et *al.*, 1989). Dans les parties abritant du couvain, les abeilles ventileuses coordonnent leur travail avec les abeilles porteuses d'eau afin de maintenir une hygrométrie élevée, comprise entre 90 et 95 % d'humidité, en particulier pour l'incubation des œufs et l'élevage du premier stade larvaire (Doull, 1976). Au contraire, dans les parties abritant les réserves, les ventileuses diminuent l'hygrométrie pour déshydrater le nectar.

1.3.1.7 Gardienne

Entre 12 et 25 jours, les ouvrières ont pour fonction de protéger la colonie en surveillant l'entrée de la ruche. En cas de danger pour la colonie, les gardiennes adoptent une posture d'intimidation puis délivrent des phéromones d'alerte pour appeler les autres gardiennes et les orienter vers l'agresseur (Wager & Breed, 2000). Si le danger persiste, elles piquent.

1.3.1.8 Butineuse

A l'âge de 21 jours, l'ouvrière va sortir de la ruche pour récolter la nourriture nécessaire au développement de la colonie : le pollen, le nectar et l'eau. Cette tâche est la plus épuisante et la plus risquée ; ces abeilles vont effectuer au maximum 10 voyages de 3 km par jour. Les butineuses ont une durée de vie d'environ 1,5 mois pendant la période favorable. Pour être la plus efficace possible, l'abeille va récolter le nectar et le pollen au plus proche de la ruche puis indiquer à ses congénères le lieu de butinage par différentes danses (Michelsen, 1993 ; Nieh, 2010). Pour la récolte du pollen, source de protéines et vitamines, l'abeille frotte ses pattes antérieures sur les pistils des fleurs, puis elle se nettoie et transfère le pollen sur ses troisièmes pattes en rajoutant du nectar afin de former une pelote. Pour la récolte du nectar, source de glucides, l'abeille aspire le nectar des fleurs et le stock dans son jabot puis, une fois arrivée à la ruche, elle le régurgite et le donne aux abeilles présentes dans la

ruche. Pour la récolte de l'eau, les abeilles apportent l'eau essentielle à la fabrication de la nourriture, à l'hydratation des larves et au refroidissement de la colonie.

En réalité, il existe une plasticité dans le temps des tâches à effectuer par une ouvrière en fonction des besoins de la colonie (Figure 7) (Gould & Gould, 1993). La perte d'une certaine classe d'abeilles induit une accélération ou un retard de développement des abeilles restantes pour combler le manque (Robinson et *al.*, 1989 ; Robinson, 1992 ; Giray & Robinson, 1994). Une grande quantité de larves et les disponibilités en ressources de la colonie accélèrent la maturation des abeilles en butineuse (Schulz et *al.*, 1998).

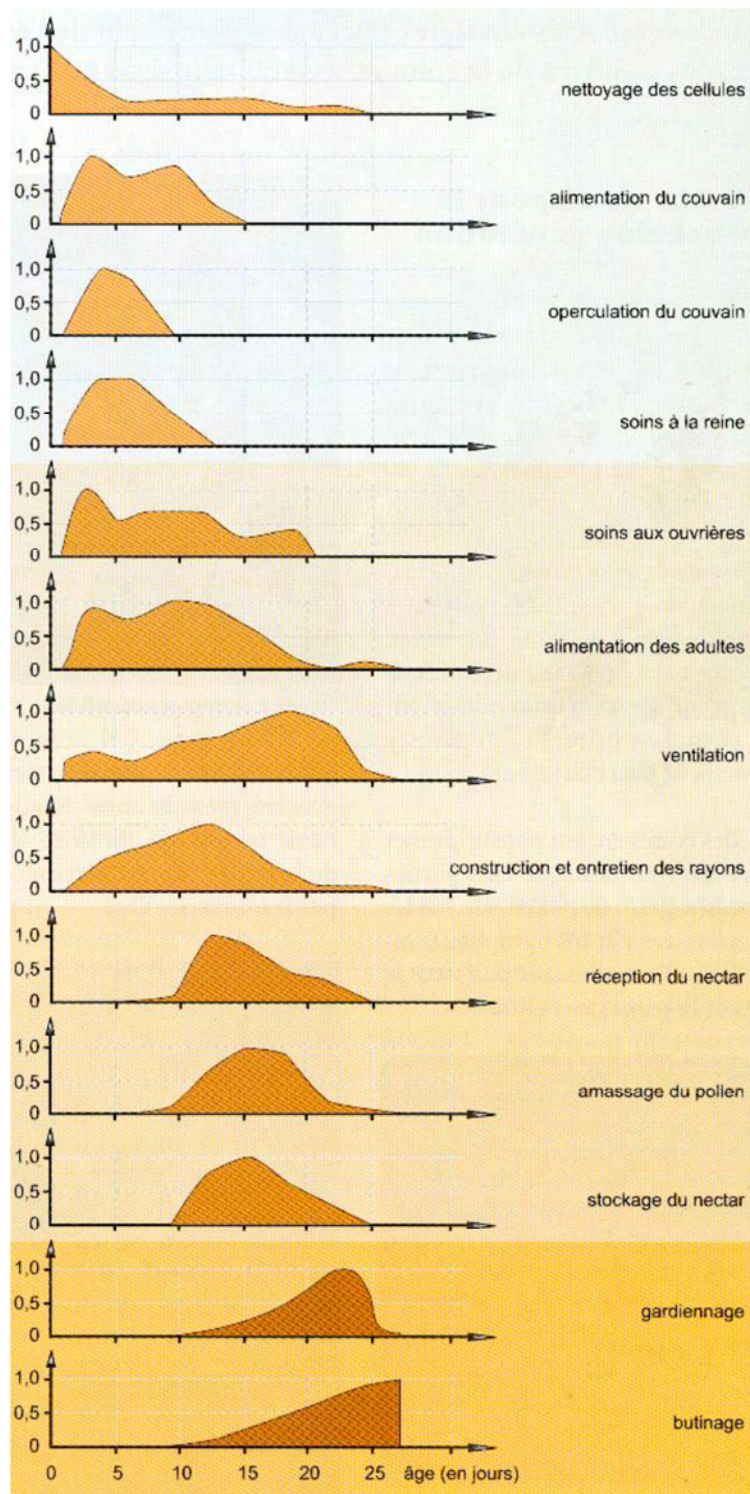


Figure 7 : Travaux effectués durant la vie d'une ouvrière (Le conte, 2002).

I.3.2 Le mâle

Les mâles, aussi appelés faux-bourçons, pèsent entre 196-225 mg. Ils sont plus grands, plus larges et plus lourds qu'une ouvrière et ne possèdent pas de dard (Figure 8) (Winston, 1993). Ils jouent un rôle principalement dans la reproduction et peuvent également participer à la ventilation en cas de forte chaleur (Belzunces et *al.*, 1996). Grâce à un mécanisme musculaire, la reine peut pondre des œufs non fécondés contenant $n=16$ chromosomes qui donneront lieu à une descendance exclusivement mâle. Ce phénomène est appelé la parthénogenèse arrhénotoque (Vandame, 1996). Lors de la reproduction d'un mâle (haploïde) avec une reine (diploïde), la descendance recevra la totalité des gènes paternels soit 50% de la génétique et la moitié des gènes maternels soit 25% de la génétique. Les ouvrières issues du même père possèdent 75% d'identité génétique et sont appelées des super-sœurs. Au printemps, durant la période d'accouplement des reines, les mâles sont nourris et bien traités par les ouvrières. Pendant l'été, ils sont seulement acceptés, tandis qu'en automne, ils sont chassés ou tués. Leur temps de vie au stade adulte ne dépasse pas 60 jours et souvent moins en cas d'accouplement, qui peut leur être fatal (Brown & Baer, 2005 ; Page & Peng, 2001).



Figure 8 : Faux bourçons (encerclés) et ouvrières sur un cadre de couvain operculé.

I.3.3 La reine

La reine se différencie des autres individus de la ruche par la grande taille de son abdomen, son poids plus élevé et ses ailes plus courtes après la fécondation (Figure 9). Durant son stade larvaire, elle consomme uniquement de grandes quantités de gelée royale pendant environ 4 à 6 jours lui permettant d'atteindre un poids variant entre 178 et 292 mg à l'âge adulte (Winston, 1993). Une semaine après sa naissance, la reine s'accouple une seule fois avec 6 à 30 mâles durant un vol d'accouplement, elle stocke le sperme dans un organe spécialisé appelé spermathèque. La reine peut pondre jusqu'à 2000 œufs fécondés par jour, ils sont issus de pères différents donnant naissance à une fratrie qui permet d'augmenter la diversité génétique de la colonie (Oldroyd et *al.*, 1995). La reine a aussi une fonction

de cohésion dans la colonie par la sécrétion de phéromones (Pankiw et *al.*, 2004) ; son temps de vie est de 1 à 5 ans.



Figure 9 : Une reine d'abeilles.

I.4. Développement

Le temps de développement n'est pas le même pour tous les individus de la colonie, Il est différent pour chaque caste d'abeilles et varie en fonction de facteurs environnementaux comme la chaleur et l'humidité. Ainsi, Winston (1993) a montré que le développement pouvait durer entre 14 et 17 jours pour la reine, 16 et 26 pour les ouvrières, 20 et 28 jours pour les mâles, et pour autant être considéré comme normal. Toutes les castes effectuent huit stades de développement différents pour atteindre l'état adulte : un stade œuf, cinq stades larvaires, durant lesquels un maximum d'énergie sera emmagasiné, un stade nymphal, durant lequel aura lieu la métamorphose qui conduira à l'émergence et le stade adulte durant lequel seront effectuées les différentes tâches au sein de la colonie (Figure 10).

I.4.1 Développement des ouvrières

I.4.1.1 L'œuf

L'œuf est blanc et cylindrique, il mesure entre 1,3 à 1,8 mm et pèse entre 0,12 à 0,22 mg. Durant trois jours, l'œuf se développe en utilisant la vitelline qu'il contient comme seule source énergétique. Au début du développement l'œuf est en position verticale dans la cellule et son implantation forme un angle droit avec le fond de l'alvéole. Il va ensuite progressivement s'incurver et s'incliner pour finir par s'allonger et se courber dans le fond de l'alvéole. Au bout de trois jours, la membrane est dissoute et donne naissance à une larve de stade L1 qui pèse environ 0,1 mg (Alberti & Hänel, 1986, Winston, 1993).

I.4.1.2 La larve

A son éclosion, la larve L1 flotte dans une petite quantité de gelée royale. Elle est blanchâtre, segmentée, courbée et sans yeux. Durant son développement, la larve va consommer toute la nourriture distribuée par les nourrices sans jamais déféquer afin de préserver l'intégrité microbienne de sa nourriture (Tableau 3) (Webster & Peng, 1988). La larve va ainsi multiplier son poids par environ 1500 en 5,5 jours et muer quatre fois (Rembold et *al.*, 1980). Les ouvrières vont consommer de la gelée royale durant les 2 ou 3 premiers jours, puis jusqu'à la fin du stade larvaire, un mélange de miel et pollen appelé bouillie larvaire. Ces différents aliments sont composés de 60 à 80% de sécrétions des glandes hypopharyngiennes et de 20 à 40% de sécrétions des glandes mandibulaires (gelée royale) (Sammataro & Avitabile, 1998) ainsi que de pollen et de miel (Tableau 3). A la fin du stade larvaire, elles pèsent en moyenne entre 140 à 165 mg. Ces variations sont dues aux aléas environnementaux, aux réserves disponibles et à des différences entre les espèces d'abeilles. Une fois que les larves au stade L5 ont fini de consommer toute la nourriture, les ouvrières operculent la cellule avec un bouchon de cire et la larve passe au stade LS en se redressant et en tissant un cocon. Pour cela, elle va osciller la tête de droite à gauche en déposant la soie sur l'alvéole en cire grâce à ses glandes séricigènes et effectue 5 tours dans la cellule. On parle alors de larve LS (*spinning*) qui va déféquer pour la première fois entre les différentes couches de soie (Jay, 1964). Après le tissage du cocon, la larve s'immobilise et passe au stade de pré-nymphe. Une cinquième mue est observée avant le passage au stade de nymphe (Jay, 1964).

Tableau 3 : Nourriture distribuée par les abeilles nourrices au couvain d'ouvrières (Sammataro & Avitabile, 1998).

Jours	Stade de développement	Alimentation
1	Oeuf	Vitelline
2	Oeuf	Vitelline
3	Oeuf	Vitelline
4	Larve L1	Gelée royale
5	Larve L2-L3	Gelée royale
6	Larve L3	Gelée royale/miel et pollen
7	Larve L4	Miel et pollen
8	Larve L5	Miel et pollen
9	Larve L5	Miel et pollen

1.4.1.3 La nymphe

Au stade nymphe l'abeille subit une métamorphose et passe de la forme de larve à celle d'un adulte reconnaissable. Le développement va se poursuivre par une pigmentation des yeux en rose puis

en rouge et pour finir en marron. La cuticule va quant à elle se colorer en brun puis en noir. Parallèlement, les pattes et les ailes vont se dessiner à la surface de la cuticule avant de prendre leur forme de membres. Ces différentes étapes de développement sont autant de jalons permettant de déterminer l'âge de la nymphe (Jay, 1962 ; Rembold et *al.*, 1980). À la fin du stade de nymphe, une dernière mue est réalisée. L'imago obtenu perfore la cuticule à l'aide de ses mandibules puis émerge de l'alvéole.

I.4.1.4 L'abeille adulte

L'adulte naissante, appelée aussi imago, présente une cuticule molle qui peut mettre plusieurs heures à sécher et durcir. A ce stade, le développement des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires commence, la maturité est atteinte trois jours après la naissance. Dix jours plus tard, c'est au tour des glandes cirières de se développer (Gould & Gould, 1993). Vingt jours après, des gènes spécifiques impliqués dans le système olfactif et de mémorisation sont exprimés dans la tête de la butineuse ; ils lui permettent d'effectuer son rôle de récolte de la nourriture pour la colonie (Alaux et *al.*, 2009).

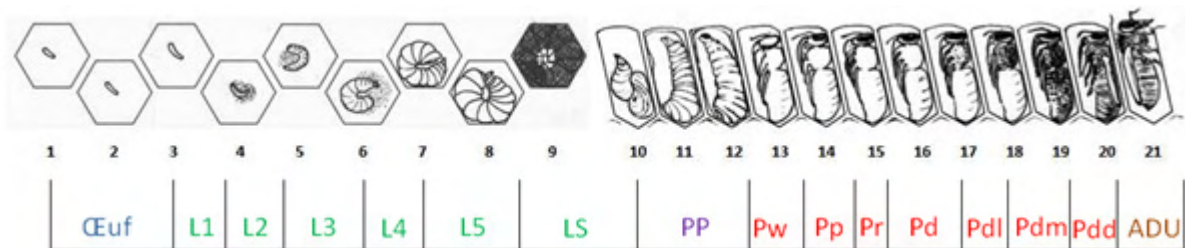


Figure 10: Diagramme des différents stades de développement en fonction de l'âge de l'ouvrière en jour L1, L2, L3, L4 et L5 = stades larvaires 1, 2, 3, 4 et 5 ; LS = redressement de la larve qui tisse le cocon ; PP = immobilisation de la larve après tissage du cocon ou prénymphe ; Pw = Nymphe aux yeux blancs ; Pp = Nymphe aux yeux roses ; Pr = Nymphe aux yeux rouges marrons ; Pd = Nymphe aux yeux marrons foncés ; Pdl = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule claire ; Pdm = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule de couleur intermédiaire ; Pdd = Nymphe aux yeux marrons foncés et à la cuticule foncée ; ADU = Ouvrière adulte ou imago. (Jay, 1962 ; Rembold et *al.*, 1980 ; Colin, communication personnelle).

I.4.2 Les mâles

La durée de développement d'un mâle, le plus long parmi les différentes castes d'abeilles, est d'environ 24 jours. Le stade larvaire est effectué en 6,3 jours soit un jour de plus que l'ouvrière. Les larves mâles se développent dans des cellules de plus grande taille et de forme différente que celles des ouvrières. A la fin du stade larvaire, le mâle atteint un poids d'environ 200 mg, ce qui représente le double de poids d'une ouvrière. De même, Le stade de prénymphe à l'émergence dure environ 15 jours soit deux jours de plus que celui d'une ouvrière. Une fois adulte, il faut une semaine au mâle pour que ses organes sexuels deviennent matures.

I.4.3 La reine

Le temps de développement d'une reine est le plus court des trois castes et dure seulement 17 jours. Le stade larvaire est effectué en 4,6 jours soit une journée de moins que celui des ouvrières pour un poids final d'environ 250 mg soit plus de 2 fois le poids d'une ouvrière. Les larves de reine se développent dans des cellules spécifiques construites au-dessus des alvéoles d'ouvrières ou sur le côté du cadre. Elles sont plus imposantes que les cellules d'ouvrières et de mâles. Le stade de prénymphe à l'émergence est réalisé en 9,5 jours soit une journée de moins qu'une ouvrière. Une semaine après sa naissance, ses organes sexuels sont matures (Tableau 4).

Tableau 4 : Temps de développement moyen des trois castes d'abeilles (Donzé, 1995 ; Rembold et *al.*, 1980 ; Winston, 1993 ; Jay, 1964).

Stades de développement du couvain d'abeilles			Durée de chaque stade (jours)			
			Reine	Mâle	Ouvrière	
Stade œuf			3,0	3,0	3,0	
Stades larvaires	1		4,6	6,3	5,5	
	2					
	3					
	4					
	5	Non operculé		1,4	2,1	1,5
		Operculé avant et pendant le tissage du cocon				
Operculé après le tissage du cocon ou prénymphe		1,5	2,5			
Stade nymphale			4,6	8,9	8,0	
Stade imago ou pré-émergent			0,9	1,2	0,8	
Temps nécessaire pour un développement total (jours)			16,0	24,0	21,0	

I.4.4 Le maintien des castes

La communication est la pierre angulaire du maintien des castes et de leurs fonctions. Cet échange est surtout réalisé par le biais de phéromones émises par chaque caste et par le couvain. La reine produit essentiellement des phéromones par ses mandibules appelées Queen Retinue Pheromone (QRP) qui lui permettent d'interagir avec toutes les castes. Certaines phéromones comme la 9-Oxo-(E)-2-Decenoic Acid (ODA) attirent les mâles pour la reproduction et contribuent à maintenir les ouvrières proches d'elle ; d'autres, comme l'éthyl palmitate, empêchent le développement ovarien des ouvrières (Slessor et *al.*, 2005 ; Brockmann et *al.*, 2006). Le couvain a une forte influence sur le

comportement des ouvrières grâce à la production de différentes phéromones appelées BroodPheromone (BP). Les larves peuvent indiquer leurs besoins aux ouvrières, par exemple par l'émission de méthyl linoléate, qui augmente la quantité de gelée royale déposée par les ouvrières (Le Conte et *al.*, 1995). Au moment de l'operculation des cellules, les larves produisent 4 phéromones en grande quantité (le méthyl linolénate, le méthyl linoléate, le méthyl oléate et le méthyl palmitate) (Le Conte et *al.*, 1994 ; Le Conte et *al.*, 2006). Le couvain a la capacité d'inhiber le développement ovarien des ouvrières avec des phéromones similaires à la reine (Mohammedi et *al.*, 1998 ; Le Conte et *al.*, 2001) et de modifier le comportement des nourrices ou de butineuses en agissant sur leur maturation et leur temps de vie en produisant de la E- β -ocimène (Maisonnette et *al.*, 2010 ; Johnson, 2010). Les ouvrières utilisent quant à elles les phéromones pour communiquer entre elles pour la défense de la colonie et pour éviter de visiter les mêmes fleurs lors du butinage (Pankiw, 2004 ; Giurfa, 1993). Les ouvrières peuvent également intervenir dans le changement de caste par la quantité de gelée royale délivrée aux larves, et par conséquent sur leur développement et leur croissance des larves (Hartfelder & Rembold, 1991 ; Rachinsky, 1990).

II. LE DECLIN DES COLONIES

Le phénomène de déclin des colonies, très médiatisé depuis une quinzaine d'années, reste mal compris des scientifiques et des apiculteurs. Il touche surtout l'Europe et les États-Unis avec une chute du nombre de colonies comprises entre 27% et 49% entre 1961 et 2007 (van Engelsdorp & Meixner, 2010), alors que d'anciennes revues apicoles témoignent d'une mortalité naturelle d'environ 10%. Dans d'autres régions du monde, le nombre de colonies d'abeilles a cependant augmenté : de 426% en Asie, de 130% en Afrique et de 83% en Amérique du Sud. De même, à l'échelle mondiale et sur les cinquante dernières années, le cheptel apicole a globalement augmenté de 45% (Aizen & Harder, 2009). Cette idée de déclin est davantage liée à l'inquiétude face à ce phénomène de surmortalité des abeilles domestiques qu'à une véritable diminution du nombre de colonies. En revanche, le mot déclin prend tout son sens lorsque nous nous intéressons aux abeilles sauvages. En 2006, une étude montrait une diminution de la richesse spécifique en abeilles sauvages en Grande-bretagne et aux Pays-Bas dans plus de 50% des parcelles étudiées avant et après 1980 (Biesmeijer et *al.*, 2006). C'est cette surmortalité des abeilles domestiques et la diminution des populations des pollinisateurs sauvages qui sont à l'origine des préoccupations écologiques et économiques.

II.1. Phénomène de déclin rapide

Le syndrome d'effondrement des colonies ou Colony Collapse Disorder (CCD) caractérise une perte rapide et massive de la population d'abeilles avec des réserves en pollen et en miel toujours

présentes dans les ruches sans retrouver d'abeilles mortes à l'intérieur. La population d'abeilles est réduite à une reine avec quelques ouvrières, du couvain ouvert et fermé. Ce phénomène a été observé en Amérique du Nord, au début des années 2000, puis un peu plus tard en France et dans d'autres pays Européens (van Engelsdorps, 2009). Le syndrome d'effondrement des colonies est encore inexpliqué. En 2009, une étude menée par van Engelsdorp pour tenter de comprendre et trouver les facteurs induisant le CCD n'a pas permis d'identifier de facteur pouvant expliquer à lui seul ce phénomène. En revanche, dans les colonies victimes de CCD, une grande quantité de parasites (*Varroa*) et une grande quantité de traitement anti-*Varroa* ont été retrouvées dans les ruches.

II.2. Phénomène de déclin lent

Depuis les années 1990, les scientifiques tentent de déterminer l'origine de ce déclin. Malgré les efforts mis en œuvre, aucune cause unique ne peut expliquer l'ensemble des pertes. Ces études ont tout de même mis en avant plusieurs causes explicatives pouvant affaiblir les colonies dont certaines semblent avoir un impact plus important que d'autres comme l'appauvrissement des ressources florales, la présence de pathogènes et la pollution environnementale (Brown & Paxton, 2009).

II.2.1 Diminution de la diversité florale

L'action humaine a un fort impact sur le paysage agricole à champs ouverts et bocages. Le remembrement d'environ 15 millions d'hectares de terre entre les années 1960 et 1980 a permis la formation de grandes parcelles après la destruction des obstacles physiques comme 750 000 km de haies vives, fossés et chemins. Cela a permis de faciliter l'exploitation agricole des terres et l'établissement de grandes superficies cultivées en monoculture. La contrepartie a été une raréfaction des haies et un appauvrissement de la diversité et de la disponibilité florales (Decourtye et *al.*, 2010). Cela diminue la diversité et la disponibilité des ressources alimentaires ainsi que les sites de nidification pour les abeilles domestiques et sauvages (Winfrey et *al.*, 2009 ; Bommarco et *al.*, 2010). L'importance d'une nourriture suffisante et équilibrée pour la résistance des abeilles à différents stress a été prouvée par différentes équipes scientifiques. Par exemple, l'abeille présente un affaiblissement des défenses immunitaires lorsqu'elle consomme une faible quantité de pollen (monoflorale) (Alaux et *al.*, 2011), de même qu'une malnutrition des larves les rend plus susceptibles à des pathogènes larvaires comme *Aspergillus* (Foley et *al.*, 2012).

En Europe, depuis 2008, la Politique Agricole Commune (PAC) donne des subventions aux agriculteurs qui laissent leur terre en jachère dans un but environnemental. Ils doivent y planter des fleurs pour créer des jachères dites « faune sauvage, pollinique ou florale ». Cela a pour but d'augmenter les zones de refuge pour les animaux et d'augmenter la diversité des plantes.

II.2.2 Organismes prédateurs et pathogènes

L'abeille est présente sur tous les continents et s'adapte très bien aux différents paysages (ville, forêt, montagne, etc.). Les territoires fréquentés par l'abeille sont très vastes et diversifiés. Les butineuses vont rencontrer une grande diversité de prédateurs et parasites durant leur vie. En 2007, aux États-Unis, une étude a permis de montrer que les ruches étaient contaminées par de nombreux agents pathogènes pour l'abeille. Les plus fréquemment rencontrés sont le *Varroa*, les bactéries responsables de la loque américaine et européenne ainsi que de nombreux virus et champignons. (Yang & Cox-Foster, 2007). Un rapport de l'Agence nationale de sécurité sanitaire (Anses) a fait un constat similaire dans les ruchers français (Anses, 2005).

II.2.2.1 Frelons

Les frelons se nourrissent d'autres insectes comme les mouches, les guêpes, les sauterelles et les abeilles. Depuis longtemps présent en Europe, le frelon européen a une taille de 25 à 40 mm. Son abdomen est de couleur jaune vif à son extrémité, alors que son thorax est plutôt de couleur noire ou marron. Le frelon asiatique mesure entre 25 et 30 mm de long et se différencie par la couleur du bout de son abdomen, qui est orange, et par la présence d'une tache orange sur sa tête. Les essaims d'abeilles sont harcelés tout l'été par les frelons qui restent en vol stationnaire devant la sortie de la ruche et attendent l'arrivée d'une abeille. Les frelons s'attaquent aux butineuses, ce qui diminue les apports de nourriture et affaiblit la colonie. Certaines colonies meurent après l'attaque des frelons ou sont du moins très affaiblies pour passer l'hiver.

II.2.2.2 Champignons

Différentes espèces de champignons peuvent infecter les abeilles et avoir des effets pathogènes. Les plus prévalents sont *Ascosphaera apis* et *Nosemaceranae*. Le premier est un champignon filamenteux qui cause une infection létale chronique du couvain appelée maladie du couvain plâtré. Cette maladie reste peu pathogène malgré une étude montrant de grandes différences de virulence en fonction des souches (Vojvodic et al., 2011). *Nosema* est un microchampignon parasite intracellulaire mis en cause dans la surmortalité des abeilles. Il peut infecter toutes les castes d'abeilles par voie orale (Higes et al., 2006). Ce parasite se développe dans l'intestin moyen des abeilles et provoque une diminution de leur capacité de digestion, de défense contre des pathogènes et diminue le temps de vie. (Higes et al., 2007).

II.2.2.3 Bactéries

Les bactéries les plus virulentes pour le couvain d'abeille sont *Melissococcus plutonius* et *Paenibacillus larvae* responsables respectivement de la loque européenne et américaine. La bactérie *P.*

larvae traverse l'épithélium intestinal pour atteindre l'hémocèle où elle va se reproduire et induire la mort de la larve (Yue et *al.*, 2008). L'Anses a montré au cours d'une étude menée entre 2002 et 2005 que 22 à 39% des ruchers étaient affectés par la loque américaine (Anses, 2005). La bactérie *M. plutonius* se multiplie uniquement dans l'intestin de la larve et induit sa décomposition. Ce phénomène va se traduire par une coloration de la larve du blanc au noir en passant par le jaune puis le marron et un affaissement de la larve (Bailey, 1961).

II.2.2.4 Virus

L'abeille domestique est confrontée à une quinzaine de virus pathogènes. Le plus virulent est l'IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus), présent dans 83% des colonies victimes du CCD aux États-Unis contre 5% des colonies saines (Cox-Foster, 2007). En France, il est présent dans 5 des 35 ruchers étudiés par l'Anses (Anses 2005). Le virus DWV (Deformed Wing Virus), est présent en Europe, en Amérique, en Afrique et en Asie (Allen & Ball, 1996 ; Ellis & Munn, 2005). La quantité de virus augmente chez les individus infectés durant l'hiver et diminue donc le temps de vie des abeilles (Prisco et *al.*, 2011 ; Dainat et *al.*, 2012). À cette période, les dommages engendrés par ce virus sont positivement corrélés avec la densité de *Varroa*.

II.2.2.5 Le Varroa

Varroa destructor est un acarien ectoparasite dont la répartition à ce jour est mondiale. Il est retrouvé dans 35 à 50% des ruchers français selon une étude menée par l'Anses entre 2002 et 2005 (Anses 2005). Le *Varroa* est maintenant considéré comme étant la plus grande menace d'origine biologique de l'abeille domestique. Il parasite les larves, les nymphes et les adultes, se nourrissant de leur hémolymphe. Il entraîne des malformations, une diminution du taux de protéines de l'hémolymphe et du poids des individus. De plus, c'est un vecteur de nombreux virus tel que l'IAPV et le DWV (Weinberg & Madel, 1985 ; Prisco et *al.*, 2011 ; Dainat et *al.*, 2012). En l'absence de traitement efficace, le nombre de *Varroa* dans une ruche peut passer de 10 à 10 000 en trois ans (Rinderer et *al.*, 2001).

II.2.3 Pesticide

II.2.3.1 Origine agricole

Les premiers insecticides utilisés remontent à 3000 ans avec l'utilisation du soufre sur de nombreuses cultures ; le soufre présentant aussi un intérêt pour la croissance des plantes (engrais) (Casida & Quistad, 1998). Au XV^{ème} siècle, des éléments naturels toxiques étaient utilisés, comme l'arsenic, le mercure ou le plomb. Il faudra attendre la fin du XIX^{ème} siècle pour qu'apparaissent des composés plus sophistiqués (Casida & Quistad, 1998). Des composés organiques sont alors extraits de

plantes comme le pyrethrum, la rotenone et la nicotine (Ambrose & Haag, 1936). Les insecticides organiques synthétiques, quant à eux, sont apparus entre les années 1930 et 1940. Le premier insecticide, herbicide et fongicide est le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) (Casida & Quistad, 1998). Aujourd'hui, il existe environ 700 pesticides pouvant agir sur 95 cibles biochimiques différentes appartenant aux insectes, aux plantes ou aux moisissures (Casida, 2009). La plupart des insecticides ciblent le système nerveux dont les éléments sont très conservés dans l'évolution. Les pesticides ont évolué dans le but d'être de plus en plus efficaces et spécifiques de leurs cibles. Les doses efficaces de produit utilisées ces 30 dernières années représentent 1 à 10% de celles qui étaient utilisées avant (Tomlin, 2006). La spécificité est améliorée par la recherche de cibles précises. Par exemple, les herbicides agissent principalement en bloquant différentes voies de la photosynthèse comme l'Atrazine qui empêche la photosynthèse II ; les insecticides peuvent également empêcher le développement des larves par l'utilisation d'analogues d'hormone juvénile (IGR) (Casida, 2009).

II.2.3.2 Origine apicole

Les apiculteurs effectuent des traitements vétérinaires sur leurs ruches afin de les aider à lutter contre les différents agents pathogènes. Ces traitements sont le plus souvent orientés vers la lutte contre le *Varroa*. Ce sont des composés chimiques issus de l'industrie pharmaceutique ou des préparations artisanales à base de produits naturels. En France, cinq traitements possèdent des Autorisations de Mise sur le Marché (AMM). Deux traitements à base de composés chimiques comme l'Apivar ND (molécule active : Amitraz, famille des formamides), l'Apistan ND (molécule active : tau-fluvalinate, famille des pyréthriinoïdes) et trois produits vétérinaires comme le Thymovar (molécule active : Thymol, famille des huiles essentielles), l'Apiguard ND (molécule active : thymol, famille des huiles essentielles), Apilife-var ND (molécule active : thymol 76%, eucalyptol 16%, camphre 3,8%, menthol 3,8%, famille des huiles essentielles).

Il existe d'autres molécules non utilisées en France, mais utilisées en Europe comme le Coumaphose (famille des organophosphates) et la Fluméthrine (famille des pyréthriinoïdes).

Il faut souligner le fait qu'une des molécules les plus utilisées en France pour lutter contre *Varroa* (l'amitraz) est interdite dans d'autres pays européens comme l'Autriche, la Belgique, Chypre, le Danemark, l'Estonie, la Finlande, l'Islande, la Norvège, la Suède, l'Allemagne, la Grèce, la Hongrie, l'Irlande, la Lettonie, la Lituanie, Malte, les Pays-Bas, la Bulgarie et le Royaume-Uni (Vidal-Naquet, 2009).

▪ Amitraze

L'Amitraze (Figure 11) appartient à la famille chimique des formamides. Il est volatil et instable dans les produits de la ruche. De fait, il est dégradé complètement en quelques semaines. Le seul métabolite stable est 2,4-diméthylaniline (DMA), non dangereux pour l'homme aux doses rencontrées (Kilani et al., 1981 ; Osano et al., 2002 ; Hong et al., 2009). En revanche, cette molécule

est connue pour avoir des effets tératogènes et cancérogènes (Osano *et al.*, 2002 ; IARC : Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1987). L'Amitraze présente les meilleurs résultats en termes d'efficacité et de reproductibilité (Vandame, 2010). D'après le document d'AMM, le traitement doit être effectué sous forme de bandelettes placées pendant 6 semaines dans la ruche. Afin d'améliorer l'efficacité du traitement, il est conseillé de laisser la bandelette pendant 10 semaines (Faucon *et al.*, 2007). Cette molécule est un neurotoxique, elle se fixe sur les récepteurs de l'octopamine (Evans & Gee, 1980). Il y a peu d'informations sur son mode d'action des formamides comme l'Amitraze (Chen *et al.*, 2007). Des cas de résistance sont apparus à partir des années 1991 en Sibérie et en 2001 en France (Dujin *et al.*, 1991).

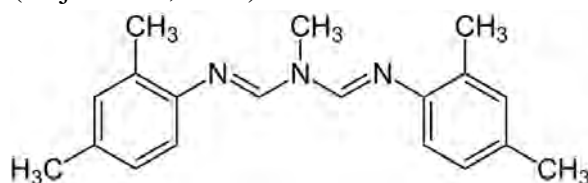


Figure 11 : Structure chimique de l'Amitraze.

▪ Tau-Fluvalinate

Le Tau-fluvalinate (Figure 12) est non volatil et lipophile avec un temps de demi-vie élevée (5 ans) (Bogdanov *et al.*, 2004). Il est surtout retrouvé dans les cires, mais aussi dans le miel (Lodesani *et al.*, 2008 ; Wallner, 1999). C'est un composé de synthèse de la famille des pyréthrinoïdes. Le traitement est effectué sous forme de bandelettes placées pendant 6 à 8 semaines dans la ruche. Il est neurotoxique et agit principalement sur la transmission de l'influx nerveux par le blocage des canaux sodium et calcium du *Varroa* (Colin *et al.*, 1997 ; Rosenkranz *et al.*, 2010). Il a été montré qu'il avait des effets délétères sur les abeilles et plus particulièrement sur le développement des mâles et des reines (Haarmann *et al.*, 2002). Les premiers phénomènes de résistance des *Varroas* au Tau-fluvalinate sont apparus en Italie en 1992 et en 1997 dans le reste de l'Europe (Colin *et al.*, 1997 ; Milani, 1999).

Des traitements alternatifs et naturels à base de thymol sont apparus il y a vingt ans. Aucune résistance n'est connue jusqu'à aujourd'hui. Certains apiculteurs fabriquent eux-mêmes leurs traitements à base de solution de thymol et de différents types d'acides comme l'acide oxalique et formique (Imdorf *et al.*, 1995 ; Rickli *et al.*, 1991).

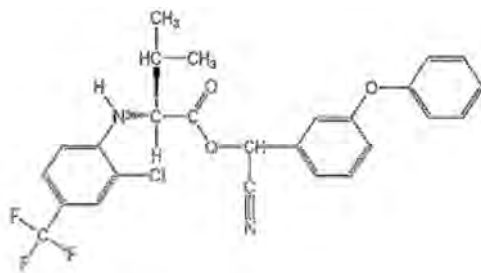


Figure 12 : Structure chimique de la Tau-Fluvalinate.

▪ Acide oxalique

L'acide oxalique ne possède pas d'AMM en France. Ce composé est non volatil et hydrosoluble. Il est présent dans le miel et les fruits à l'état naturel (Wallner, 1999 ; Charrière & Imdorf, 2002). Il est capable d'éliminer les *Varroas* mais à des concentrations supérieures à celles présentes dans la nature. Il peut être utilisé de trois façons différentes : par dégouttement (déposé en goutte à goutte entre les cadres de la ruche), par sublimation (mise en place de cristaux dans la ruche) ou par pulvérisations d'une solution aqueuse sur les abeilles. Le traitement est réalisé en deux fois à deux semaines d'intervalle et après la récolte du miel (août et septembre) pour ne pas en affecter la qualité (Charrière et *al.*, 1998). Le site d'action de l'acide oxalique n'est pas connu. En revanche, des effets mortels et délétères ont été observés sur l'abeille, plus précisément une augmentation significative de la mortalité des abeilles et des altérations sur les organes internes des larves et des adultes (Gregorc et *al.*, 2004).

▪ Acide formique

L'acide formique est un composé organique hydrophile et volatil qui ne s'accumule pas dans le miel et dans les cires mais qui est naturellement présent en faible concentration dans le miel (Bogdanov, 2005). Il ne dispose pas d'une AMM. Le traitement est effectué entre deux miellées par évaporation de l'acide. Il faut éviter les traitements lors de fortes chaleurs, car ceux-ci provoquent alors des pertes de reine (Charrière et *al.*, 1998). Comme pour l'acide oxalique, le site et le mode d'action de l'acide formique n'est pas connu (Rosenkranz et *al.*, 2010).

▪ Les huiles essentielles et le thymol

Cent cinquante huiles essentielles ont été testées pour connaître leurs effets acaricides sur *Varroa*. Parmi les composés testés, seul le thymol s'est imposé pour la lutte biologique contre cet acarien (Imdorf et *al.*, 2006). Le thymol est une molécule naturelle extraite de l'huile essentielle de plantes, majoritairement du thym. Le thymol est un mono-terpène, lipophile et volatil. Il n'est pas dangereux pour l'homme aux doses rencontrées, mais peut altérer le goût du miel. Le seuil de tolérance en France est de 0,8 mg/kg de miel (Isman, 2000 ; Emsen & Dodologlu, 2009). Après traitement des ruches, il s'accumule dans la cire et le miel mais sa concentration diminue avec le temps

(Tableau 5) (Bogdanov et *al.*, 1998 ; Floris et *al.*, 2004 ; Norzal, 2002). Le traitement est appliqué en début d'automne après les dernières récoltes de miel. Des bandelettes imbibées de thymol, eucalyptol, menthol et camphre sont alors placées dans la ruche. Le temps de traitement et le nombre de bandelettes varient en fonction des protocoles et des quantités de thymol présentes dans chaque formulation. La température extérieure joue un rôle très important dans l'efficacité du traitement. En dessous de 20°C, les traitements ne sont plus efficaces et au-dessus de 30°C, ils sont toxiques pour l'abeille.

Tableau 5 : Récapitulatif des résidus de thymol retrouvé dans la cire et le miel après traitement des ruches.

Résidus de thymol retrouvés dans la cire en g/kg de cire						
Mode de traitement	Temps de traitement (semaine)	Temps écoulé entre le traitement et l'échantillonnage (semaine)	Concentration moyenne du thymol	Ecart type	Auteur	Année
Apilife Var	6 à 8	0	2,12	0,66 à 4,75	Bogdanov	1998
Apilife Var	6 à 8	35 (8 mois)	0,67	0,17 à 1,99	Bogdanov	1998
Apilife Var	2	0	0,021	± 0,013	Floris	2004
Apiguard	2	0	0,147	± 0,188	Floris	2004
Résidus de thymol retrouvés dans l'alimentation en mg/kg de cire						
Mode de traitement	Temps de traitement (semaine)	Temps écoulé entre le traitement et l'échantillonnage (semaine)	Concentration moyenne du thymol	Ecart type	Auteur	Année
Apilife Var	6 à 8	0	4,6	2,07 à 7,54	Bogdanov	1998
Apilife Var	2	35 (8 mois)	1,9	0,62 à 7,54	Floris	2004
Apiguard	2	0	0,62	± 0,57	Floris	2004
Cristaux de thymol	4	1	0,96	± 0,61	Nozal	2002
Apilife Var	4	32		0,03 à 0,1	Bogdanov	1994

Plusieurs études ont porté sur les effets des traitements à base de thymol sur les colonies. Une étude menée sur l'impact du traitement par l'Apilife VAR a mis en évidence une absence de toxicité pour les abeilles adultes mais un déplacement de la nourriture et du couvain proche des bandelettes (Imdorf et *al.*, 1995). Une étude qui portait sur l'effet d'un traitement à l'Apiguard, a permis de montrer une toxicité du thymol sur les jeunes larves mais pas sur les adultes (Mattila et *al.*, 2000). Lorsque les traitements sont réalisés dans de mauvaises conditions, il devient toxique pour les larves et les adultes (Imdorf et *al.*, 1995).

II.2.3.3 Origine multicausale

Après avoir longtemps recherché la cause unique expliquant le déclin des insectes pollinisateurs, les scientifiques s'orientent vers plusieurs causes. Holmstrup et *al.*, (2010) a résumé les connaissances existant sur les effets de synergie qui existent entre les stress environnementaux et chimiques chez différents insectes. Des effets de synergie similaires ont déjà été observés chez l'abeille, comme une augmentation de la sensibilité des ouvrières lorsqu'elles sont confrontées à un parasite (*Varroa*) et à une molécule chimique (fipronil), ou deux molécules chimiques différentes ou encore un virus et une molécule chimique (Vidau et *al.*, 2011 ; Locke et *al.*, 2012 ; Dainat et *al.*, 2012). De plus, les ruches placées dans une zone pauvre en ressources polliniques les affaiblissent et les rendent plus vulnérables à l'action conjointe des agents stressants (Alaux, 2011), de sorte que s'il était impossible d'expliquer la surmortalité des abeilles par une cause unique comme l'exposition aux polluants ou par la charge parasitaire, il est maintenant probable que la surmortalité soit liée à l'action concomitante de plusieurs causes.

III. LE THYMOL

III.1. Structure chimique, famille de composé

Le thymol (5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol) ou CAS 89-83-8 dont la formule brute est $C_{10}H_{14}O$ a une masse moléculaire de 150,22 g/mol. Le thymol est une molécule lipophile avec un pKa de 10,59. Le thymol est vendu sous forme de cristaux incolores avec une odeur caractéristique. C'est un terpène qui fait partie de la famille des monoterpènes. Les monoterpènes ont un rôle protecteur pour les plantes contre différentes pressions comme celles exercées par les herbivores et les bactéries (Huang et *al.*, 2010).

Le thymol est naturellement synthétisé dans les plantes avec deux unités d'isopréniques qui elles-mêmes sont obtenues par la voie de l'acide mévalonique à partir du coenzyme A (Gershenzon, 1990). Il peut aussi être synthétisé de manière chimique par une alkylation du m-crésol avec de l'isopropanol et du propylène (Amandi et *al.*, 2005). Il existe différents dérivés du thymol en fonction des espèces de plantes. Il a un rôle protecteur pour la plante avec une activité antibactérienne (Lucchini et *al.*, 1990 ; Fuselli et *al.*, 2006). Il existe aussi des molécules semblables dans le monde animal, par exemple certains neurotransmetteurs (Figure 13).

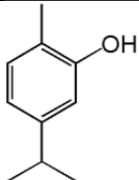
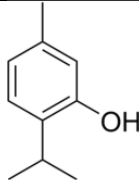
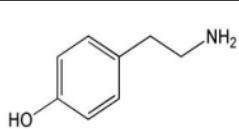
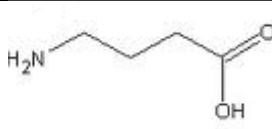
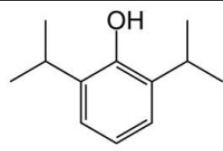
				
Carvacrol	Thymol	Tyramine	GABA	Propofol

Figure 13 : Les différentes molécules présentant une structure proche du thymol.

III.2. Mode d'action

Les caractères physicochimiques du thymol lui permettent de se fixer sur différents récepteurs. Le site de fixation du thymol chez l'abeille n'est pas connu. Mais il a été montré que chez la drosophile le thymol se fixe à la fois sur le récepteur de l'Acide γ -AminoButyrique (GABA), sur le récepteur de la tyramine et sur le TransientReceptorPotential (TRP). Ces récepteurs sont impliqués dans des fonctions biologiques importantes comme l'odorat, la mémoire et la mobilité (Priestley et *al.* 2003 ; Enan, 2005 ; Parnas et *al.* 2009). Le thymol est une molécule non sélective qui agit sur de nombreux organismes. L'avantage est, à ma connaissance, qu'aucune résistance de *Varroa* au thymol n'a été observée jusqu'à maintenant.

Les récepteurs de l'Acide γ -AminoButyrique (GABA). Chez les insectes, trois types de récepteurs sont capables d'inhiber la transmission du signal nerveux : le récepteur au GABA, le récepteur au glutamate, et le récepteur histamine gated (Nässel, 1999 ; Buckingham et *al.*, 2005). Le récepteur GABA est exprimé durant le stade de nymphe et de l'adulte (Barbarar et *al.*, 2005). Il est présent dans le système nerveux et dans les cellules musculaires (Lummis, 1990). Il joue un rôle important dans la locomotion des insectes (Alford & Grillner, 1991). Le récepteur GABA est déjà la cible de nombreux pesticides comme le fipronil.

Le récepteur de la tyramine. Le récepteur de la tyramine est exprimé durant le stade de larve nymphe et le stade adulte (Mustard et *al.*, 2005 ; Selcho et *al.*, 2012), dans le cerveau de l'abeille. La tyramine est impliquée dans des fonctions biologiques importantes telles que l'olfaction, la mémoire, la fécondité et la mobilité chez la larve (Selcho et *al.*, 2012). Le thymol en se fixant au récepteur de la tyramine se comporte comme un analogue et peut modifier l'équilibre de synthèse de différents neurotransmetteurs qui sont produits à partir de la tyrosine (Monastirioti et *al.*, 1996) (Figure 14). De plus, différentes études ont montré qu'un taux élevé de tyramine est toxique pour les larves de drosophile car il diminue leur viabilité, leur mobilité et produit un retard de l'ecdysis (Torfs et *al.*, 2000 ; Saraswati et *al.*, 2004 ; Mustard et *al.*, 2005).

Une autre étude a montré qu'un pathogène du couvain (*Melissococcus pluton*) produit de la tyramine qui est mortelle pour les larves d'abeilles à une dose de 0,3 mg/larve (Kanbar et *al.*, 2004).

Des familles d'insecticides ciblent le récepteur de la tyramine comme les Organophosphates et carbamates.

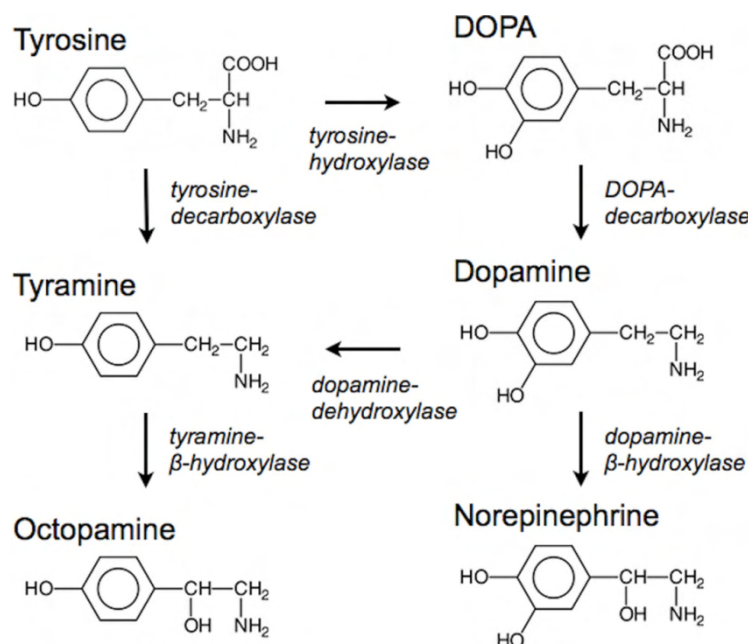


Figure 14 : Équilibre formé pour la synthèse de différents neurotransmetteurs à partir de la tyrosine (Barron, 2010).

Le récepteur TransientReceptorPotential (TRP). Il est essentiel au canal pour les senseurs biologiques. Il détecte tous les changements de l'environnement et permet une réaction de l'individu. Chez le *C.elegans*, le carvacrol, thymol et eugénol sont connus pour avoir un effet inhibiteur sur cette famille de récepteurs (Lei et *al.*, 2010). Le plus connu est le menthol qui procure une sensation de froid chez la souris (Xiao et *al.*, 2008). Leur présence dans les larves de drosophile n'est pas prouvée (Rosenzweig et *al.*, 2008).

III.3. Métabolisme et toxicologie

Le thymol affecte le système nerveux de différents organismes en se fixant sur différents récepteurs. Mais il provoque d'autres effets qui ne s'expliquent pas par cette action de fixation.

III.3.1 Aux niveaux cellulaires

Plusieurs études ont démontré que le thymol est toxique pour les cellules eucaryote et procaryote. Pour les cellules procaryotes, le thymol semble agir au niveau de la perméabilité des membranes cellulaires (Lambert et *al.*, 2001 ; Xu et *al.*, 2008) et de la synthèse d'ATP (Ahmad et *al.*, 2010). Le thymol est toxique pour certaines cellules impliquées dans l'immunité chez différents organismes en déclenchent notamment l'apoptose dans les cellules dendritiques de la souris (Xuan et *al.*, 2010) ; il induit également des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes humains et sur

la moelle osseuse du rat (Azirak & Rencuzogullari, 2008 ; Buyukleyla & Rencuzogullari, 2009). Il peut aussi avoir des effets sur l'immunité cellulaire. De plus, à forte concentration, le thymol peut provoquer des problèmes de digestion chez le cochon par un déséquilibre de la flore intestinale (Michiels et al., 2010).

III.3.2 Les acariens et les insectes

Le thymol est toxique pour *Varroa* à tous les stades de son développement : les œufs, les larves, les nymphes et les adultes (Daemon et al., 2009 ; De Oliveira Monteiro et al., 2009 ; De Oliveira Monteiro et al., 2010). Cette toxicité tout au long du développement a aussi été observée chez l'anophèle : que ce soit au stade œuf, larve ou adulte (Pandey et al., 2009). Le thymol induit des effets sublétaux chez *Phaenicia sericata* adulte, chez qui la fréquence des battements d'ailes est diminuée par l'action du thymol sur la contraction musculaire (Waliwitiya et al., 2010). Les effets du thymol sur les abeilles ont été étudiés après traitement des ruches et en laboratoire. Après le traitement des ruches, une mortalité des jeunes larves est observée avec dans le même temps un changement de comportement des adultes (Imdorf et al., 1995 ; Mattila et al., 2000). En 2008, l'équipe de Loucif-Ayad a démontré que le thymol induisait un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de l'activité de la glutathione S-transférase chez les abeilles adultes. En revanche, ils n'ont pas observé de changement d'activité de l'acétylcholinestérase, cette enzyme étant un marqueur des effets neurotoxiques. L'intoxication expérimentale d'abeilles adultes en laboratoire a montré une diminution de leur survie (Damiani et al., 2009). Des effets secondaires après une intoxication des adultes au thymol sont mis en avant par le travail de l'équipe de Bergougnot avec la diminution de la phototaxie des abeilles. D'autres effets secondaires après une intoxication des adultes au thymol sont observés par l'équipe de Boncristiani, Ils ont montré des variations d'expression du gène de la vitellogénine impliqué dans le développement, une variation d'expression de certains P450 qui sont impliqués dans le système de détoxification de phase I et des variations d'expression d'un facteur de transcription impliqué dans l'immunité cellulaire. Le thymol a montré un intérêt dans lutte préventive de différents pathogènes de l'abeille comme *Ascosphaera apis* (Collin et al., 1989) et *Nosema ceranae* (Maistrello et al., 2008). Lorsque les abeilles adultes consomment une alimentation contaminée par *Nosema ceranae* et du thymol, elles vivent plus longtemps que celles qui consomment une alimentation contaminée seulement avec *Nosema ceranae* (Costa et al., 2009).

III.3.3 Les mollusques

Comme chez les arthropodes, des effets neurotoxiques ont été observés chez les mollusques. Plus particulièrement chez *Lymnaea acuminata*. Le thymol induit chez cette espèce une diminution de l'activité des enzymes neuronales comme l'AcétylCholine Estérase (AChE) et le Lactate

DésHydrogénase (LDH) et agit sur la quantité des neurotransmetteurs comme le 5-HydroxyTryptamine (5-HT) et la DopAmine (DA) (Singh et *al.*, 1999).

III.3.4 Les mammifères

Comme chez les insectes, Le thymol active le système de détoxification chez la souris en augmentant l'activité de la 7-EthoxyCoumarin O-Deethylase (ECOD), du Glutathion S-Transférase (GST) et de la Quinone Réductase (QR) (Sasaki et *al.*, 2005). Des métabolites secondaires du thymol sont retrouvés dans l'urine de personnes volontaires ayant consommé 1,08 mg de thymol. Ces métabolites sont du thymol sulfate et du thymol glucuronide (Kohlert et *al.*, 2002).

IV. METHODES D'ETUDE DE LA TOXICITE SUR LES ABEILLES

Pour se prémunir de nombreuses espèces dites nuisibles, l'Homme disperse volontairement dans la nature (et dans la ruche) des substances toxiques, le plus souvent synthétiques. Pour évaluer l'impact de ces substances sur les organismes qui ne sont pas ciblés et définir les risques associés, certaines espèces animales ont été choisies comme modèles d'étude. Initialement choisie pour représenter les *Apoidea*, soit plus de 20 000 espèces, l'abeille domestique *Apis mellifera* est un sujet d'étude d'autant plus pertinent qu'elle est l'outil de travail de plusieurs millions d'apiculteurs et participe activement par son activité pollinisatrice au maintien de la biodiversité végétale (Decourty et *al.*, 2013).

Compte tenu de son fonctionnement en société, étudier en laboratoire la toxicité d'une substance sur l'abeille s'est révélé complexe du fait de l'influence de son environnement social sur sa vitalité. En effet, il est très difficile de maintenir en vie plus de 80% d'abeilles adultes au-delà de 20 jours de contention, alors qu'au sein d'une colonie, les abeilles d'hiver survivent plus de 90 jours (Münch et *al.*, 2013). Il existe en revanche, des méthodes de laboratoire très efficaces pour étudier la toxicité de substances sur les larves d'abeille, puisqu'elles permettent la totalité du développement larvaire chez près de 95% des individus (Aupinel et *al.*, 2005 ; Hendriksma et *al.*, 2011). En général, ces méthodes sont assez efficaces pour étudier la toxicité aiguë d'une substance et permettent de définir des valeurs de référence utiles à l'évaluation du risque. Toutefois, elles ont démontré certaines limites au moment d'aborder la toxicité chronique des substances, c'est pourquoi des méthodes d'étude de la toxicité chronique ont été développées dans des conditions semi-contrôlées généralement sous tunnel insecte-prof, et en plein champs. Elles présentent l'avantage majeur de pouvoir étudier la toxicité d'une substance sur un individu prélevé dans un contexte plus réaliste qu'en laboratoire et d'étudier l'impact de la substance au niveau de la colonie. Toutefois, l'interprétation des résultats générés par ces méthodes souffre des nombreux facteurs confondants liés à la complexité de

l'environnement des abeilles (qualité et quantité de l'alimentation, agents infectieux et parasites, etc.) et sont difficilement reproductibles. Il n'existe donc pas de méthode d'étude parfaite et appréhender la toxicité d'une substance sur l'abeille implique le recours à plusieurs méthodes d'étude.

Les méthodes les plus connues pour étudier la toxicité de substances sur l'abeille sont celles développées et adoptées pour évaluer le risque engendré par les produits phytosanitaires, mais elles sont également appliquées pour déterminer la toxicité d'autres substances comme les médicaments vétérinaires ou les OGM. Il s'agit d'une part de l'essai de toxicité aiguë permettant de définir une Dose Létale 50 (DL50) orale ou topique à 48 h sur ouvrières adultes (CEB 95) et d'autre part de l'essai sous tunnel permettant de caractériser l'effet d'un traitement dans une micro parcelle sur les butineuses et le développement de la colonie (CEB 230) en définissant des valeurs de référence comme un NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) et un LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level). Toutefois, il existe d'autres méthodes permettant d'étudier les effets toxiques d'une substance, mais leur usage dans un cadre réglementaire n'a toujours pas été adopté en raison d'un manque de standardisation. Ces méthodes permettent notamment d'étudier les effets létaux et sublétaux de substances sur d'autres castes (*e.g* faux-bourçons) ou d'autres stades développementaux (*e.g* stade larvaire) et sont particulièrement appréciées pour des applications expérimentales. Elles permettent également d'étudier, parfois avec une grande maîtrise des conditions d'exposition, l'impact d'une substance sur des traits physiologiques ou comportementaux particuliers de l'abeille. Une partie de ces méthodes sont compilées et décrites dans un rapport de l'AESA (Autorité Européenne pour la Sécurité des Aliments) paru en 2012 (EFSA, 2012)

IV.1. Méthodes d'étude de la toxicité aiguë

La toxicité d'une substance pour un organisme est classiquement traduite par une DL50, c'est-à-dire la quantité de substance pour laquelle 50% des individus meurent après une exposition unique. Cette valeur généralement déterminée après 24h ou 48h, permet de classer les substances selon leur toxicité et traduit l'impact à court terme d'une seule exposition. La DL50 est à la base de la définition de quotient de risque (HQ) utilisé au début de la procédure d'évaluation du risque des produits phytosanitaires (Halm et *al.*, 2006). Elle permet d'obtenir le HQ, calculé en faisant le rapport de la quantité de substance pulvérisée par hectare (g/Ha) par la DL50 ($\mu\text{g}/\text{abeille}$). Lorsque le HQ est inférieur à 50, alors la substance évaluée sera classée non toxique pour l'abeille et la procédure s'arrêtera à la détermination de la DL50. Ainsi, compte tenu de l'importance de la DL50 dans le processus d'homologation, une méthode standardisée a été validée et adoptée par la Commission Internationale des Relations Plantes-Abeille (ICPBR) en Europe et la Commission des Essais Biologiques (CEB) en France.

Cette méthode permet d'évaluer la toxicité des substances sur des abeilles dites « tout venant », c'est-à-dire des abeilles adultes d'âge inconnu prélevées sur des cadres de corps de ruche. Il s'agit alors d'exposer en une seule fois, par ingestion (DL50 orale) ou par contact (DL50 topique), des lots d'abeilles maintenues dans des cagettes de contention (Type Pain) avec des doses croissantes de substances à tester et d'évaluer la mortalité induite 24 h et 48 h après l'exposition. L'analyse des mortalités en fonction des doses de substances testées permet par la suite de déterminer la DL50. Ainsi, le risque associé à l'exposition des abeilles à une substance est initialement évalué sur la base d'une DL50 obtenue sur des abeilles adultes.

Il existe également une méthode permettant de déterminer une DL50 sur larves d'abeille (Aupinel et *al.*, 2005), mais cette méthode n'a toujours pas été insérée dans le processus d'évaluation des produits phytosanitaires. Cette méthode mise au point par un groupe français de l'INRA en 2005 sera détaillée dans le chapitre matériel et méthode de ce manuscrit. Brièvement, cette méthode consiste à récupérer de jeunes larves récemment écloses pour les élever au laboratoire, soit avec une alimentation contenant des concentrations croissantes de la substance à tester (DL50 orale), soit en appliquant directement des doses croissantes de substance sur des larves élevées avec une alimentation standard (DL50 topique). Généralement l'analyse de la mortalité et la détermination de la DL50 se fait 48 h après l'exposition.

Concernant les autres castes de la colonie, il n'existe pas de méthodes permettant d'étudier la toxicité aiguë d'une substance. L'absence de méthode pour étudier cette toxicité chez les reines et les faux-bourçons semble en partie liée à la faible probabilité qu'ont ces deux castes d'être exposées de façon aiguë à un toxique, mais également aux difficultés techniques rencontrées pour la réalisation de test en laboratoire (La reine et les faux-bourçons sont nourris par les ouvrières ce qui complexifie les conditions de contention et diminue la maîtrise des doses administrées par l'expérimentateur).

IV.2. Méthodes d'étude de la toxicité chronique

En général, les abeilles sont rarement exposées à une dose forte unique de substance toxique au cours de leur vie. La plupart du temps, elles sont soumises de façon chronique à de faibles doses de substances dont les effets toxiques peuvent être létaux ou sublétaux. C'est pourquoi pour reproduire ces conditions, des méthodes d'étude de toxicité chronique ont été développées. Il peut s'agir de méthode pratiquée en laboratoire, en conditions semi-contrôlées ou encore en pleins champs. Dans le cas des méthodes de laboratoire, la toxicité chronique d'une substance s'exprime par l'intermédiaire de la concentration létale 50, c'est-à-dire la concentration de substance dans une matrice (*e.g* aliment, cire, etc.) pour laquelle 50% des individus meurent après une exposition continue ou répétée. Le temps au bout duquel est mesuré la mortalité varie, généralement en fonction du stade développemental étudié, de la durée de vie de l'organisme ou de la durée d'exposition théorique à la substance. A

l'échelle de la colonie, la CL50 est difficilement accessible techniquement et d'autres paramètres comme la NOAEL et la LOAEL sont mesurés et sont généralement très utiles pour comprendre la toxicité chronique d'une substance. Les méthodes les plus souvent appliquées sont celles utilisant des cagettes d'élevage ainsi que la méthode CEB 230 pratiquée sous tunnel utilisée dans la procédure d'évaluation des PP lorsque le HQ d'une substance est supérieur à 50.

La méthode pratiquée sous tunnel permet d'étudier les effets d'une substance pulvérisée dans une micro-parcelle sur la mortalité des abeilles (couvain et adulte), l'activité de butinage et la dynamique générale d'une colonie placée dans un tunnel de 4 x 10 m. Après le traitement d'une micro-parcelle fleurie, la colonie est suivie pendant 1 mois durant lequel différentes variables sont régulièrement mesurées et l'impact du traitement sur ces variables est ensuite analysé. Cette méthode apporte des informations importantes sur le développement de la colonie, mais des problèmes de production de couvain liés au confinement sont régulièrement observés y compris dans les colonies témoins.

Les méthodes d'études de la toxicité chronique pratiquées en cagette (Suchail et *al.*, 2001 ; Aliouane et *al.*, 2009) permettent d'exposer en continue des abeilles à une substance et d'en mesurer les effets létaux et sublétaux. Ces effets sont généralement suivis jusqu'à ce qu'une mortalité de 10% soit atteinte chez les abeilles témoins.

IV.3. Les effets sublétaux

Si elle ne provoque pas la mort de l'individu, la toxicité aiguë ou la toxicité chronique d'une substance peuvent être à l'origine d'effets délétères plus discrets qualifiés de sublétaux. Il s'agit d'altérations de la physiologie ou du comportement des abeilles qui diminuent leur vitalité ou affectent leur activité au sein de la colonie. Ces effets peuvent être mis en évidence au laboratoire mais également en conditions naturelles grâce à la mise en œuvre de nouvelles technologies comme le compteur à abeille (Dusaubat et *al.*, 2013) ou les puces RFID (Decourtye et *al.*, 2010 ; Henry et *al.*, 2012). Les effets d'une substance toxique sur un organisme peuvent être multiples et dépendants ou indépendants de leur mode d'action primaire, c'est pourquoi il est souvent difficile de pronostiquer quelle fonction de l'organisme sera affectée au cours ou à la suite d'une exposition. Il peut s'agir de fonctions cognitives mises en jeu dans la réalisation de tâches importantes pour la colonie comme le butinage ou de fonctions physiologiques impliquées dans la survie ou la défense de l'individu comme l'immunité et la détoxification.

La plupart des méthodes permettant d'étudier des effets sublétaux comportementaux se sont focalisées sur les fonctions d'apprentissage et d'orientation des abeilles, deux fonctions essentielles à la récolte du précieux nectar. Les effets sublétaux sur l'apprentissage peuvent par exemple être testés par la méthode d'extension conditionnée du proboscis qui permet de déterminer si une substance

affecte l'apprentissage d'une odeur chez une butineuse (Giurfa & Sandoz, 2011) ou encore par le test pratiqué dans un labyrinthe et qui permet d'étudier l'effet d'une substance sur les capacités d'orientation d'abeilles placées sur un parcours préalablement appris (Zhang & Maleszka 2006). D'autres méthodes permettant d'évaluer les effets sublétaux de substance sur l'orientation des abeilles ont été développées, mais la dernière en date présente un intérêt particulier puisqu'elle permet d'étudier en conditions naturelles, le vol de retour des butineuses marquées avec des puces RFID qui signale leur arrivée dans la ruche grâce à un dispositif de détection électronique. Grâce à cette méthode Henry et *al.*, (2012) ont récemment pu montrer que des butineuses exposées dans le champ à des doses sublétales de thiaméthoxame mettaient plus de temps à retourner dans la ruche, quand elles ne se perdaient pas totalement.

A doses sublétales, certaines substances modifient la physiologie des abeilles ce qui peut altérer leur vitalité ou leur résistance à d'autres agents de stress chimiques ou biologiques. Pour évaluer ces effets sublétaux, de nombreuses méthodes de biochimie et de biologie moléculaire peuvent être mises en œuvre et permettent de mesurer des changements d'activités ou d'expressions de protéines à la suite d'une exposition aiguë ou chronique. Il peut s'agir de dosages enzymatiques, d'immuno-marquage ou encore de PCR quantitative. Dans la littérature, on peut constater que les recherches sur les effets sublétaux physiologiques induits par des substances toxiques se sont principalement focalisées sur les systèmes immunitaires, de détoxification et nerveux de l'abeille. En effet, il est fréquent que des substances neurotoxiques par exemple modulent l'activité du système immunitaire des abeilles (Alaux et *al.*, 2009 ; Gregorc et *al.*, 2012 ; Boncristiani et *al.*, 2012). Cela expliquerait pourquoi il est rapporté dans certaines publications que des abeilles exposées à des doses sublétales de toxique succombent plus rapidement à une infection (Aufauvre et *al.*, 2012) ou que des agents infectieux se développent davantage dans les colonies fortement contaminées par des pesticides (Pettis et al 2012 ; Wu et *al.*, 2011) .

PROBLEMATIQUE

&

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Face au plus dévastateur des parasites de l'abeille européenne *Apis mellifera* (Rosenkranz et al., 2010), les apiculteurs ont dû recourir à l'utilisation de toute une batterie d'acaricides tels que l'amitraz (formamide), le coumaphos (organophosphoré) ou le fluvalinate (pyréthrinoïde). Leur utilisation intensive s'est d'une part traduite par l'émergence de résistances chez le parasite (Rosenkranz et al., 2010), et donc par une baisse d'efficacité des traitements (Lodesani et al., 1995), mais également par une accumulation de ces molécules dans les produits de la ruche (miel, cire et pollen) (Lodesani et al., 1995) engendrant des répercussions sur la santé de l'abeille (Rosenkranz et al., 2010 ; Burley et al., 2008 ; Boncristiani et al., 2012). Les produits dits naturels sont alors apparus comme une alternative à la chimie et sont désormais de plus en plus utilisés, avec parmi eux le thymol sous ses différentes formulations (Apiguard®, Thymovar® et Apilfe®) ou encore en cocktail artisanal. Comme les autres acaricides utilisés dans la lutte anti-*Varroa*, les résidus de thymol se concentrent dans la ruche et en particulier dans la cire (Bogdanov et al., 1998 ; Floris et al., 2004) dû à la nature lipophile de ce composé, mais également dans le pollen et le miel (Rennich et al., 2012 ; Bogdanov et al., 1998 ; Floris et al., 2004 ; Adamczyk et al., 2005 ; Nozal et al., 2002). Or le pollen et le miel sont les principaux constituants de la bouillie larvaire produite et distribuée par les abeilles nourrices aux larves qui sont ainsi susceptibles d'absorber d'importantes quantités de thymol. Dans ce contexte, il apparaît donc crucial de s'assurer de l'absence d'effets toxiques du thymol sur la colonie et en premier lieu sur le couvain qui assure le renouvellement de la ruche.

Récemment, plusieurs études ont montré que le traitement au thymol entraînait un changement de comportement des adultes (Imdorf, 1995 ; Mattila, 2000), ou encore qu'une intoxication expérimentale diminuait la survie d'abeilles adultes en laboratoire (Damiani, 2009). Certaines études désigneraient même le thymol comme un larvicide : Gashout and Guzmàn-Novoa ont démontré en 2009 que l'huile de thym aurait une plus grande toxicité pour les larves que pour l'abeille adulte, alors que d'autres études montrent une mortalité pour les larves après traitement des ruches (Mattila et al., 2000 ; Imdorf et al., 1995). Le couvain serait dès lors exposé à un fort risque d'intoxication.

Face à ces données inquiétantes, des travaux restaient à mener pour investiguer plus finement les effets du thymol sur le développement du couvain d'abeilles, mais aussi dans des conditions plus appropriées à l'étude de la toxicité d'une substance chez un insecte social. C'est à cette tâche que notre recherche doctorale vise à contribuer.

Le premier objectif a donc été de s'affranchir de l'influence de l'environnement social de l'abeille pour déterminer la toxicité du thymol mais également de suivre les effets du thymol sur la totalité du développement larvaire. Pour cela, il existe une méthode de laboratoire très adaptée qui permet d'une part d'étudier la toxicité de substances sur des larves d'abeille *in vitro*, mais également sur la totalité

du développement larvaire puisque près de 95% des individus ont un développement complet (Aupinel et *al.*, 2005 ; Hendriksma et *al.*, 2011). C'est précisément cette technique qui a été adaptée au laboratoire dans le cadre des travaux doctoraux pour investiguer la toxicité du thymol sur le couvain d'abeilles. Ces premiers travaux constituent le premier objectif et ont été fondamentaux puisque la validité de tous les résultats obtenus durant la thèse était directement conditionnée par l'optimisation et par la reproductibilité des conditions d'élevage. Ces premiers travaux ont consisté à contrôler parfaitement les conditions d'élevage larvaire en veillant particulièrement à la maîtrise de certains paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement larvaire, mais également à la maîtrise de la technique de greffage.

Une fois le système d'élevage *in vitro* parfaitement établi, le second objectif du travail de cette thèse a consisté à étudier les effets létaux du thymol sur le développement des larves d'abeilles, avec dans un premier temps la détermination des concentrations en thymol ayant un effet sur la mortalité larvaire jusqu'au début du stade nymphe aux yeux blancs, suite à une exposition *via* la cire et l'alimentation. Les paramètres de toxicité aiguë et chronique du thymol ont été déterminés par le calcul de la concentration induisant 50% de mortalité des abeilles présentes initialement (CL50) et par la dose de thymol induisant 50% de mortalité de la population initiale (DL50). Les temps d'exposition choisis correspondent à deux périodes clefs : pendant les 2 premiers jours d'élevage, c'est-à-dire à la fin de la consommation de la gelée royale pure et pendant les 6 premiers jours c'est-à-dire jusqu'à la fin du stade larvaire.

Des études encore plus récentes menées en 2012 par l'équipe de Boncristiani ont montré que le thymol induisait des variations d'expression du gène de la vitellogénine, une protéine pléiotropique impliquée notamment dans le développement, une variation d'expression de certaines P450, impliquées dans le système de détoxification de phase I et des variations d'expression d'un facteur de transcription impliqué dans l'immunité cellulaire. Ces données viennent s'ajouter à celles de Loucif-Ayad qui avait démontré en 2008 que le thymol induisait un stress oxydatif caractérisé par une augmentation de l'activité de la Glutathion S-Transférase chez les abeilles adultes et suggèrent que l'intoxication par le thymol puisse avoir des effets sublétaux sur différents systèmes biologiques de l'abeille.

Or, bien que plus difficilement décelables que les effets létaux, les effets sublétaux d'un composé sont néanmoins de nature délétère, affaiblissant la population intoxiquée et la rendant de fait, plus vulnérable aux pathogènes ou aux changements environnementaux (Suchail et *al.*, 2001 ; Vidau et *al.*, 2011 ; Boncristiani et *al.*, 2012). Le troisième objectif de la thèse a donc visé à déterminer les effets sublétaux d'une alimentation contaminée au thymol sur différents paramètres développementaux que sont la croissance pondérale, l'expression de marqueurs de transcription génique de l'immunité et du développement (abaecine, vitellogénine, serpine 5, protéase à sérine 14, lysozyme, prophénol oxydase)

et l'activité enzymatique (glucose deshydrogénase, Glutathion S-Transférase, lysozyme, phénol oxydase).

Enfin, la comparaison des résultats de cette étude avec les données bibliographiques sur les niveaux de résidus de thymol dans les cires, le miel et le pollen des colonies traitées contre *Varroa* à l'aide de ce composé a permis de conclure quant au risque encouru par les larves d'abeille exposées à ce composé *via* la cire et l'alimentation.

MATERIELS ET METHODES



I. ÉLEVAGE LARVAIRE

Récemment, l'obtention d'une méthode standardisée d'élevage des larves *in vitro* a ouvert la voie à l'étude de la toxicité de composés sur le développement larvaire. Cette méthode présente en effet l'avantage majeur de pouvoir étudier la toxicité d'une substance durant tout le développement dans des conditions contrôlées et de pallier certains biais induits par des facteurs interférents lors des études *in vivo* (Aupinel et *al.*, 2005). La validité de cette méthode d'élevage pour la mesure de la toxicité aiguë d'un composé a été vérifiée pour la première fois en 2007 par Aupinel et *al.*, (2007), puis elle a été validée par d'autres laboratoires en 2009 (Aupinel et *al.*, 2007, 2009). Cette technique d'élevage a été développée dans le but de pouvoir déterminer les CL50 ou DL50 aiguës et chroniques d'un composé sur environ 300 larves greffées. Le succès de la manipulation étant validé par une mortalité inférieure à 15% dans les témoins négatifs et d'environ 30% à l'émergence des adultes (Aupinel et *al.*, 2007, 2009 ; Venderberg & shimanuki, 1987). Très récemment, une amélioration de la technique d'élevage *in vitro* des larves d'abeilles a été recommandée par Hendriksma et *al.* (2011). Cette méthode emploie le système breveté « cupularve » et se caractérise par la suppression de l'étape de greffage des larves et du stress physique qui y est lié. Dans cette méthode la reine est confinée pendant 12 heures dans le cupularve, ce qui l'oblige à pondre dans des cupules pré-intégrées. Grâce à cette méthode, seulement 2,3% de mortalité larvaire ont été enregistrés au cours de l'élevage chez les individus non intoxiqués (Hendriksma et *al.*, 2011). La rapidité de récolte des larves représente un élément crucial dans la réussite de l'élevage. Or, toujours grâce à cette méthode, 45 minutes ont suffi pour récolter 500 cupules alors qu'avec la technique originelle 30 min ont été nécessaires à Evans & Boncristiani, (2010) pour greffer 220 larves. Ces deux méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients. Elles sont toutes les deux employées pour déterminer la toxicité de composés sur le développement larvaire.

I.1. Choix de la méthode d'élevage

La méthode d'élevage des larves présentée par Hendriksma et *al.* (2011) semble plus efficace que celle décrite par Aupinel et *al.* (2005), mais il est important de souligner qu'elle présente de nombreux inconvénients. Par exemple, la durée de transfert des cupules du cupularve vers les dispositifs d'élevage ne représente qu'une fraction de la durée d'exposition des larves à des conditions défavorables à leur développement. En effet, dans la méthode originelle, l'aliment est préalablement déposé dans les cupules d'élevage et les larves sont greffées dessus. En revanche, lorsque les larves sont recueillies dans le système de cupularve, l'aliment doit être déposé délicatement en dessous de celles-ci, sans les noyer (elles mesurent 1 mm de long à ce stade). Cette étape très délicate nécessite au

moins 10 minutes supplémentaires par dispositif d'élevage (observation personnelle). Outre le temps nécessaire à cette étape, il conviendrait de mentionner les risques de contamination liés à cette technique. En effet, certains organismes, pathogènes ou non, et présents dans les cupules ayant séjourné pendant 4 jours dans les ruches peuvent contaminer les dispositifs d'élevage *in vitro*. A ce risque, s'ajoute le nombre très limité de cupules qui peuvent êtreensemencées dans chaque colonie, au maximum 110, en comparaison avec les 500 larves environ qui peuvent être prélevées par cadre lors du greffage. Enfin, bien souvent les ouvrières arrivent à distinguer les cupules artificielles des cellules naturelles et ont tendance à retirer les larves du cupularve ou à remplir les cupules par du miel lors des grandes miellés (observation personnelle). Ce problème du nombre de larves disponibles par colonie est d'autant plus limitant si des tests dans lesquels le patrimoine génétique des larves doit être pris en compte sont envisagés et où le groupement de larves provenant de différentes ruches introduirait des biais ou de trop grands écarts-types.

L'étude présentée dans ce manuscrit a nécessité pour la première fois l'élevage *in vitro* d'un grand nombre d'individus. Aucune des deux méthodes présentées ci-dessus n'a été conçue dans cette optique. La méthode présentée par Hendriksma et *al.* (2011) ne permet pas d'élever un grand nombre de larves sans l'utilisation d'un grand nombre de colonies, elle a donc été rejetée. La méthode d'Aupinel et *al.* (2005) a été choisie car elle permet, au contraire de la première, d'élever un grand nombre de larves à partir de peu de colonies. Toutefois, cette méthode, telle que décrite originellement, n'était pas adaptée à l'élevage simultanée d'un grand nombre d'individus en particulier parce que la méthode de greffage aurait contraint à exposer les larves à des conditions défavorables à leur développement pendant une période trop longue. Une adaptation de cette méthode présentée ci-après a donc été conçue.

Le savoir-faire de la méthode d'élevage a été transmis au laboratoire d'Albi au printemps 2010 suite à un séjour d'apprentissage d'une semaine réalisé au laboratoire INRA du Magneraud à Surgères. L'élevage se fait en plusieurs étapes. Les larves au stade L1 sont issues d'œufs pondus *in vivo* par des reines maintenues dans leur colonie. Ces larves sont ensuite greffées dans un dispositif spécifique et élevées *in vitro* dans des conditions optimales à leur développement.

I.2. Obtention d'une ponte des reines sans interruption hivernale

I.2.1 Matériel biologique

Les abeilles employées tout au long de cette étude sont de la souche *buckfast*. Cette espèce a été obtenue par croisement de l'espèce *Apis mellifera mellifera* et *Apis mellifera ligustica*. Les individus utilisés dans cette étude ont été prélevés au stade L1 dans quatre colonies élevées dans des ruches Dadant à 10 cadres prêtées par l'entreprise APIREM (Saint-Juery, France). Dès leur arrivée, au

printemps 2010, les reines ont été marquées et un retrait systématique des cellules royales a été effectué afin de conserver les mêmes reines durant toute la durée de l'étude.

En temps normal, la ponte de la reine subit des fluctuations saisonnières qui font que de nombreux œufs sont pondus quotidiennement pendant la période favorable, c'est-à-dire à notre latitude, de mars à octobre, alors que la ponte est quasi-inexistante pendant la mauvaise saison (Figure 15).

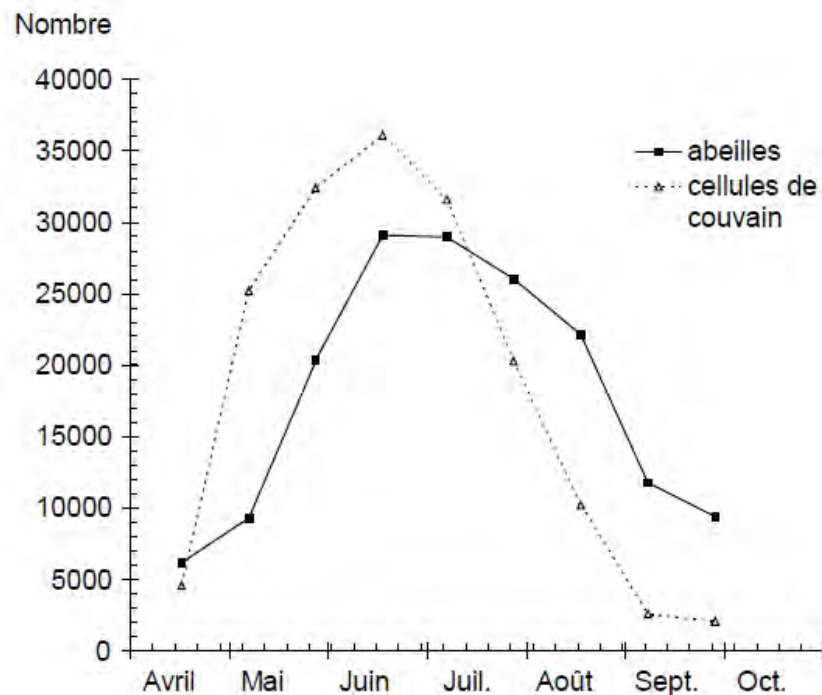


Figure 15 : Évolution de la ponte de la reine à Liebfeld (Imdorf et *al.*, 1996b).

Afin de pouvoir réaliser cette étude sans être soumis à cette interruption saisonnière de la ponte, il a été décidé de placer les ruches dans des conditions favorables à une ponte continue de la reine. Pour cela, les colonies ont été installées dans un rucher couvert, dans des ruches modifiées pour les rendre compatibles à un aménagement intérieur ; puis elles ont été stimulées au cours de la mauvaise saison par une alimentation adaptée.

I.2.2 Mise en place d'un rucher couvert

Un rucher couvert a été créé spécifiquement pour cette étude au Centre universitaire de formation et de recherche Jean-François Champollion d'Albi. Pour cela, un local d'environ 10 m² a été choisi pour son orientation Sud-Est qui l'expose au soleil du matin jusqu'au milieu de l'après-midi. Il a été isolé et chauffé à l'aide de convecteurs électriques thermostatés. Les ruches qui y ont été introduites ont ainsi pu être maintenues à une température supérieure à 21°C toute l'année. Les jours dans les menuiseries et la toiture ont été obturés afin que les abeilles ne puissent pas pénétrer dans le

local lorsque la porte de celui-ci était fermée. Cette même porte a servi d'échappatoire aux abeilles lorsque des manipulations étaient effectuées sur les colonies afin de leur permettre de rejoindre l'entrée des ruches situées à l'extérieur (Figure 16).



Figure 16 : Rucher fermé vu de l'extérieur au début de sa mise en place Au centre du carré jaune à gauche, se trouve la sortie de la première ruche installée. Au centre du losange blanc à droite celle de la deuxième ruche.

L'intérieur du local a été aménagé avec un extracteur de fumée, une lampe, une table et différents supports pour le matériel apicole (Figure 17).



Figure 17 : Rucher fermé vu de l'intérieur au début de sa mise en place. Une première ruche est installée et un premier convecteur électrique est en place. Devant ce convecteur, une cage à reine et une valise destinée aux transports des cadres entre le rucher couvert et le laboratoire sont prêts à être utilisées.

I.2.3 Adaptation et installation des ruches dans le rucher fermé

Des figures de couleurs différentes ont été peintes à l'extérieur du local afin de faciliter l'identification de l'entrée des ruches par les butineuses. Au centre de ces figures, un trou d'un diamètre supérieur à 40 mm a été percé dans le béton à l'aide d'une perceuse équipée d'une mèche de 50 mm adaptée pour forer le béton. Un tuyau en PVC d'un diamètre de 40 mm provenant de la ruche y débouche avec une pente positive de 10% afin de prévenir les entrées d'eau de pluie (Figure 16). Un dispositif de chicanes a été mis en place sur les ruches afin de permettre aux abeilles d'entrer et de sortir sans que le vent ne puisse refroidir l'intérieur de la ruche (Figure 18).

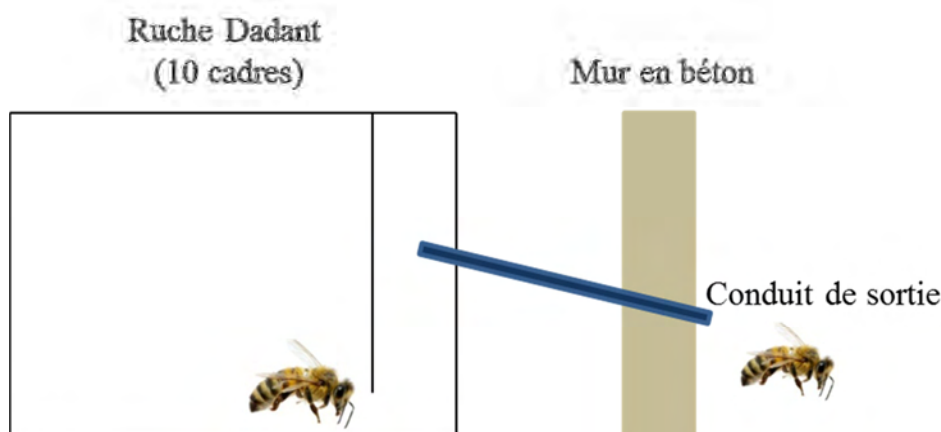


Figure 18 : Mécanisme permettant aux abeilles d'entrer et de sortir de la ruche sans que le vent ne puisse y entrer.

Des modifications ont également été effectuées sur le couvre cadre afin de permettre le nourrissage des abeilles pendant la mauvaise saison (Figure 19). La ponte a en effet été stimulée de septembre à mars en abreuvant les colonies d'eau et en les nourrissant *ad libitum* avec d'une part du sirop de sucrose à 50% et d'autre part du pain de pollen confectionné à partir de pelotes de pollen multifloral (Pollenergie, la Grabère, France) broyées à l'aide d'un mortier et agglomérées à l'aide de sirop de sucrose. Chaque orifice du couvre cadre a été obturé par une moustiquaire en plastique afin de faciliter l'opération de nourrissage.

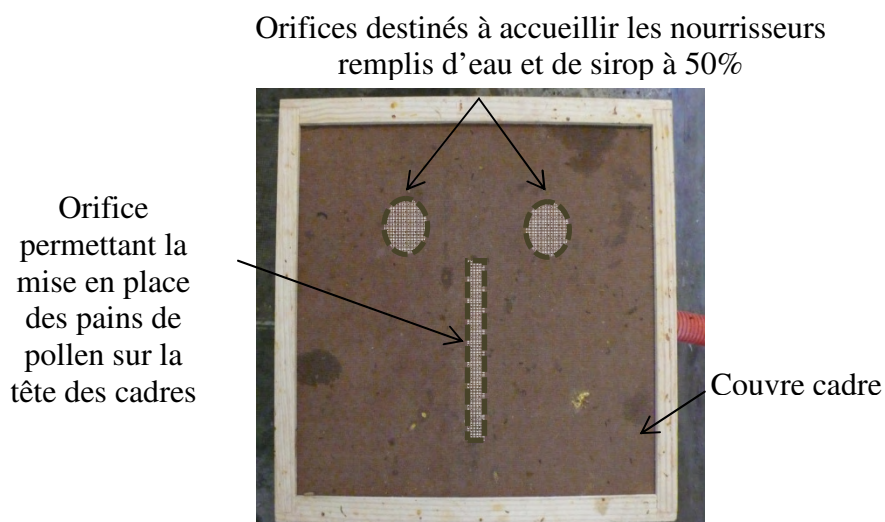


Figure 19 : Représentation schématique des adaptations réalisées sur le couvre cadre (vue de dessus) afin de le rendre compatible avec son utilisation dans le rucher couvert.

I.3. Obtention de larves d'abeille au stade L1

Les cadres de couvain destinés à être prélevés sont enfermés dans une cage à reine (Ickowich, Bollen, France), dont les grilles sont suffisamment espacées pour laisser passer une ouvrière, mais trop étroites pour laisser passer la reine (Peng *et al.*, 1992). Les cadres sont ensuite introduits dans les ruches au minimum une semaine avant le début de la manipulation (Figure 20).



Figure 20 : Cadre de couvain extrait d'une cage à reine.

Cette opération dite « d'acceptation », dure environ 30 h pendant la saison favorable et 72 h pendant la mauvaise saison (observation personnelle). Elle permet aux ouvrières de nettoyer les

alvéoles de tous les débris pouvant gêner la ponte de la reine et de déposer des phéromones caractéristiques de la colonie. Pour accélérer le nettoyage et faciliter l'acceptation du cadre, celui-ci a été placé là où il y avait le plus d'abeilles nettoyeuses, c'est-à-dire à proximité du couvain fermé et des abeilles naissantes (Figure 21).



Figure 21 : Dispositif d'encagement de la reine. Les cadres de couvain portant de jeunes larves sont placés de part et d'autre de la cage de manière à maintenir les nourrices proches de la reine favorisant ainsi la ponte. Les cadres de réserves sont placés à proximité des cadres de couvain afin de faciliter aux nourrices la procuration de miel et du pollen pour la production de nourriture larvaire.

La reine a ensuite été transférée sur le cadre préalablement accepté, qui a ensuite été réencagé et réintroduit dans la ruche entre un cadre de couvain ouvert riche en nourrices et un cadre d'adultes naissants afin de stimuler la ponte. Dans ces conditions, la cage permet alors de contraindre la reine à pondre sur le cadre tout en laissant passer librement les ouvrières pour qu'elles puissent nourrir à la fois la reine et les larves lorsque les œufs ont éclos (Peng *et al.*, 1992). Après 30 heures, la reine a été libérée afin que seuls les œufs pondus dans ce laps de temps soient présents sur le cadre. Après 3 jours d'attente, qui correspondent au temps de développement des œufs, ceux-ci ont éclos pour donner naissance à des larves de stade L1 immédiatement nourries avec une petite quantité de gelée royale déposée par les abeilles nourrices. Le cadre a alors été extrait de la ruche, désencagé, introduit dans une valise de transport et transféré dans les plus brefs délais au laboratoire afin de réaliser le greffage.

I.4. Greffage

Le greffage est l'opération qui consiste à transférer les larves présentes sur le cadre d'une ruche vers un dispositif d'élevage. Cette technique est utilisée depuis longtemps par les éleveurs de reines. Dans ce cas, une centaine d'individus femelles au stade L1 est prélevée dans une première colonie et introduite dans une deuxième colonie préalablement orphelinée. Les ouvrières de cette deuxième

colonie vont alors élever ces individus de façon à produire des reines. Dans cette étude, plusieurs milliers d'individus ont été transférés non pas dans une colonie mais dans des dispositifs d'élevage *in vitro* dans lesquels, contrairement à ce qui a lieu dans une ruche, aucune ouvrière ne peut assurer l'axénie. Des précautions particulières ont donc été prises et un local adapté a été aménagé dans le but de réaliser cette manipulation délicate dans des conditions optimales de stérilité et d'ergonomie.

I.4.1 Conditions du greffage

Une pièce d'environ 10 m² a été équipée spécialement pour accueillir les opérations de greffage. Cette pièce contient une table, des *picking* chinois en plastique (Ickowicz), un support de cadre fabriqué par nos soins, une loupe et une source de lumière froide (Figure 22). Un récipient rempli d'eau est présent en permanence dans la pièce lors du greffage afin de garantir une hygrométrie maximale. Le matériel est accessible rapidement et systématiquement nettoyé à l'éthanol 70°.



Figure 22 : Matériels de greffage. 1 : Source de lumière froide, 2 : cadre de couvain, 3 : support de cadre, 4 : loupe binoculaire, 5 : dispositif d'élevage, 6 : pissette contenant de l'éthanol à 70°, 7 : *picking* chinois.

I.4.2 Méthode de greffage

Le greffage a été réalisé à partir de larves prélevées au stade L1 et âgées de 5 à 20 heures. Pour cela, le cadre provenant de la ruche a été extrait de la valise de transport et immédiatement placé sur le support de cadre sous la source de lumière froide. Pour cette étude, le choix de l'outil de greffage s'est porté sur le *picking* chinois en plastique. Ce dernier fait partie des outils de greffage les plus utilisés avec le pinceau, le crochet, le *picking* inox professionnel et a été préféré car il est démontable,

stérilisable à l'alcool 70° et sa languette en plastique passe aisément sous les larves qui flottent sur la nourriture distribuée par les abeilles nourrices. Les larves peuvent ainsi être prélevées délicatement sans les endommager. Un *picking* a été attribué à chaque traitement et a été stérilisé à l'alcool 70° tous les 150 prélèvements. Les individus prélevés sont déposés un à un à la surface de l'aliment présent dans les cupules du dispositif d'élevage préalablement incubé pendant 1 h à 34°C, 95% d'humidité et ce, selon deux méthodes :

✓ Méthode décrite par Aupinel et *al.* (2005)

Elle consiste à distribuer tous les individus de façon homogène dans l'ensemble des dispositifs d'élevage contenant chacun un seul traitement. Ceci implique que toutes les plaques soient exposées à l'air ambiant du début à la fin du greffage.

✓ Méthode modifiée d'Aupinel et *al.* (2005)

Cette étude est la première du genre à porter sur un grand nombre d'individus pour déterminer les effets sublétaux au cours du développement larvaire chez l'abeille. Si la méthode originelle décrite par Aupinel et *al.* (2005) était utilisée dans un test portant sur un très grand nombre d'individus, elle imposerait que les larves passent jusqu'à 6 h exposées à l'air ambiant. Or, des essais préliminaires à cette étude ont montré qu'une exposition des dispositifs d'élevage à l'air ambiant pendant 1h 30 min induisait à elle seule une augmentation significative de la mortalité. Afin de limiter le temps d'exposition des larves à l'air ambiant, une distribution homogène des individus à l'échelle de chaque dispositif d'élevage a donc été imaginée afin de n'exposer chaque dispositif d'élevage à l'air ambiant que le temps nécessaire au greffage de 48 larves. En d'autres termes, selon cette adaptation de la méthode, les dispositifs d'élevage sont greffés un à un, chacun à leur tour. Chaque dispositif d'élevage accueille alors tous les traitements et la distribution des individus dans les dispositifs d'élevage est effectuée en colonne, tandis que les différents traitements sont disposés en ligne (Figure 23).

	A	B	C	D	E	F	
Sens de dépôt des larves ↓	1 ^{er} puit	9 ^{ème}	17 ^{ème}	25 ^{ème}	33 ^{ème}	41 ^{ème}	Diméthoate (0,01 mg/kg d'aliment)
							Contrôle acétone
							Contrôle eau
							Dose 1
							Dose 2
							Dose 3
							Dose 4
	8 ^{ème}	16 ^{ème}	24 ^{ème}	32 ^{ème}	40 ^{ème}	48 ^{ème}	Dose 5

Figure 23 : Plan de greffage des larves disposées sur le dispositif d'élevage verticalement pour avoir une répartition homogène des larves dans chaque traitement. La flèche désigne le sens du greffage.

I.5. Élevage *in vitro*

I.5.1 Dispositifs d'élevage

Les dispositifs d'élevage sont constitués d'une plaque de culture cellulaire de 48 puits (VWR, Fontenay-sous-bois, France), dans laquelle des sections de coton dentaire d'environ 1 cm de long ont été introduits. Ces cotons ont été imbibés par 500 µL d'eau stérile traitée à l'aide de Micropur[®] fort selon le protocole du fabricant en lieu et place d'une solution à 4 g/L de MethylBenzethoniumChloride (MBC) et à 155 g/L de glycérol dans la méthode originelle (Aupinel et al., 2005). Une cupule en plastique ou en cire préparée au laboratoire contenant 20 µL d'aliment A (Tableau 6) a ensuite été déposée sur chacun de ces cotons (Figure 24).

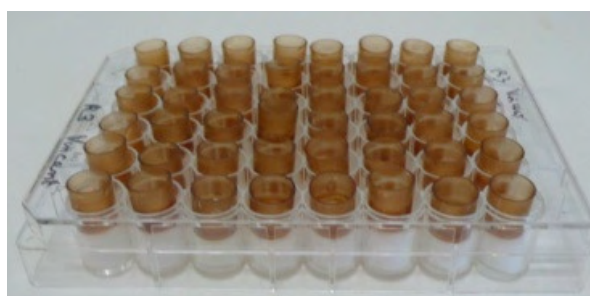


Figure 24 : Dispositif d'élevage des larves *in vitro* (Aupinel et al., 2005).

I.5.1.1 Cupules en plastique

Les cupules en plastique utilisées au cours de cette étude sont de la marque Nicot (Ickowicz). Ces cupules sont en polypropylène alimentaire recyclable et vendues par lots de 100 ou 1000 dans des

sachets non stériles. Elles mesurent extérieurement un centimètre de haut et un centimètre de diamètre (Figure 25).



Figure 25 : Cupule en plastique Nicot.

1.5.1.2 Cupules en cire

Les cupules en cire de dimensions identiques à celles des cupules en plastique Nicot ont été fabriquées au laboratoire la veille de chaque manipulation à l'aide d'un moule à cupules en silicone (Ickowicz, Bollène, France). Brièvement, un volume de cire a été incubé dans une étuve thermostatée à 65°C jusqu'à liquéfaction complète. Après 3 min sous agitation magnétique, une quantité suffisante de cire liquide a été prélevée à l'aide d'une pipette pasteur en verre et déposée dans le moule avant d'être incubée à température ambiante jusqu'à durcissement complet. Les cupules en cire ont ensuite été démoulées une à une à la main et stockées à 4°C (Figure 26).



Figure 26 : Cupule en cire fabriquée au laboratoire.

I.5.2 Compositions des aliments et fréquence des nourrissages

Les individus ont été nourris selon la méthode développée par Aupinel et *al.*, (2005). Brièvement, les aliments ont été préparés par avance au laboratoire à partir de gelée royale (la Miellerie de chanteclair, Chalenson, France), d'extrait de levure, de D-glucose et de D-fructose (Sigma, Saint-quentinFallavier, France) introduits dans des proportions variables (Tableau 6). Les aliments ont ensuite été aliquotés et stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Tableau 6 : Composition des aliments A, B et C successivement distribués aux larves au cours de leur élevage *in vitro* (Aupinel et al., 2005).

Composants des aliments A, B et C	Aliment A (%)	Aliment B (%)	Aliment C (%)
Gelée royale	50	50	50
Extrait de levure	1	1,5	2
D glucose	6	7,5	9
D fructose	6	7,5	9

Quelques minutes avant utilisation, un aliquot d'aliment a été décongelé et préchauffé pendant 30 min dans un bain thermostaté à 34°C avant d'être distribué aux larves à l'aide d'une micropipette (VWR) en quantité variable en fonction de leur âge. Les individus ont été nourris de cette manière jusqu'au 6^{ème} jour. La fréquence de distribution de l'aliment ainsi que la quantité dispensée aux larves sont détaillées dans la Figure 27, qui resitue ces nourrissages dans la chronologie des différentes étapes d'élevage.

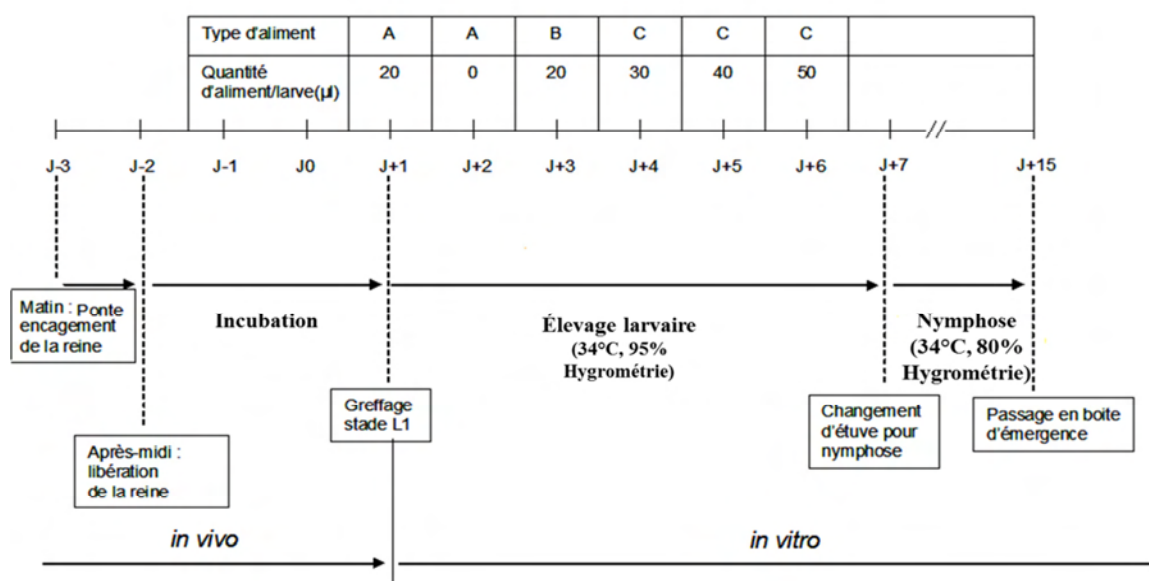


Figure 27 : Quantité d'aliment A, B et C distribuée successivement aux larves élevées *in vitro* et chronologie des nourrissages en lien avec les principales étapes de l'élevage.

I.5.3 Conditions d'élevage

Le support d'élevage et les larves ont été placés pendant sept jours dans un caisson en Plexiglass® hermétique dans lequel une hygrométrie de 95% a été obtenue à l'aide d'une solution saturée en K₂SO₄. La température de ces caissons a été maintenue à 34°C en les plaçant dans une étuve Binder (VWR) ventilée thermostatée de 750 litres (Figure 28). À la fin du stade larvaire (LS), les cotons imbibés d'eau ont été retirés des dispositifs d'élevage. Les larves ont ensuite été incubées sept

jours supplémentaires dans un autre caisson d'élevage dans lequel une hygrométrie de 80% était obtenue à l'aide d'une solution saturée en NaCl. Les solutions saturées en sels ont été renouvelées tous les deux mois afin de maintenir l'axénie initiale.

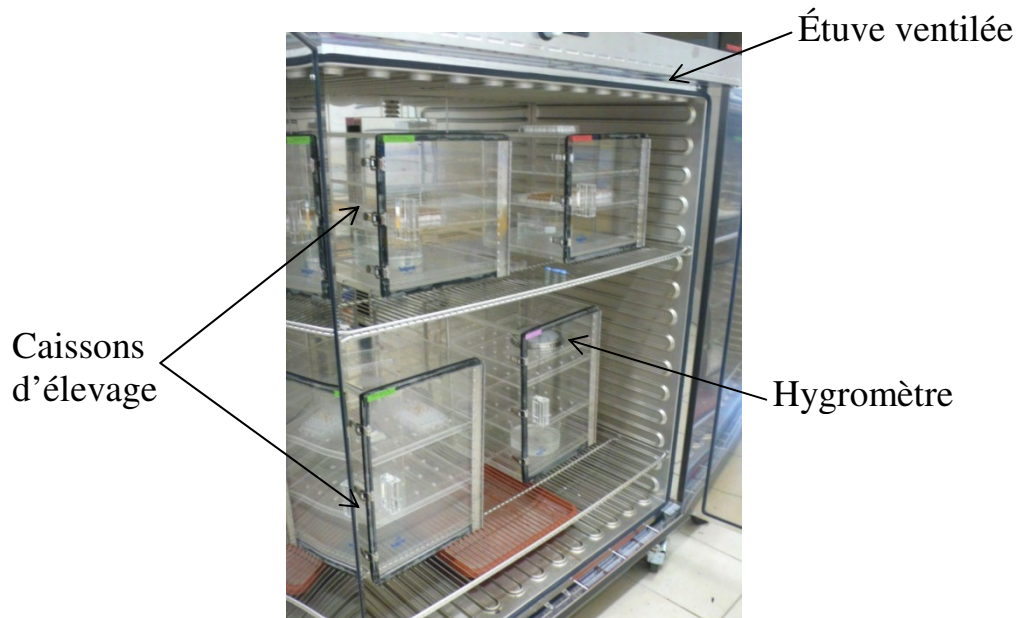


Figure 28 : Étuve ventilée thermostagée à 34°C contenant les caissons d'élevage en Plexiglass® hermétique.

I.5.4 Suivi du développement

Les individus ont été observés quotidiennement à heure fixe à l'aide d'une loupe binoculaire. Les pulsations des stigmates, traduisant la vitalité des larves greffées étaient vérifiées. Après 4 jours de développement (Figure 29A), les larves incurvées ne prennent pas toute la surface de la cupule. Vingt-quatre heures après (Figure 29B), elles occupent presque toute la surface du dispositif et à la fin du stade larvaire (Figure 29C), leur corps est en contact avec les bords de la cupule. Les individus marqués par des flèches (Figure 29C) désignent les quelques larves qui commencent à se redresser. Pour les stades antérieurs à 4 jours de développement, les larves sont de petite taille et flottent dans leur aliment.

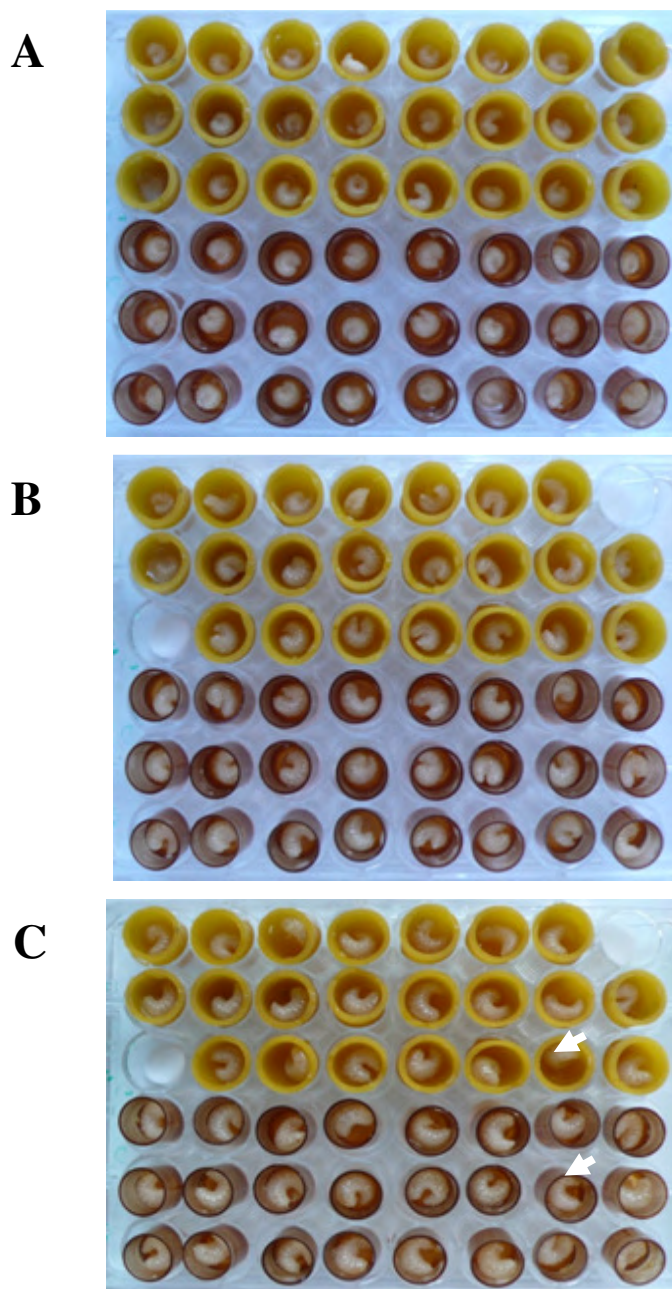


Figure 29 : Dispositifs d'élevage contenant les cupules en plastique et en cire accueillant les larves : (A) Larves 4 jours après greffage ; (B) Larves 5 jours après greffage ; (C) Larves 6 jours après greffage. Les flèches blanches désignent les quelques larves qui commencent à se redresser.

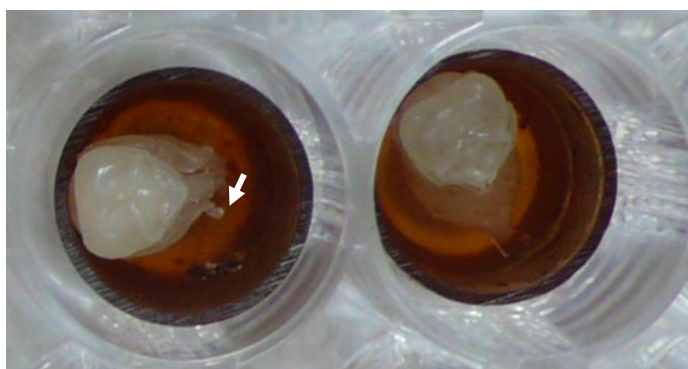
Chez les larves greffées depuis 6 jours, la quantité de nourriture restant dans la cupule a également été notée afin de témoigner d'un éventuel retard de développement. Les larves mortes sont caractérisées par l'absence de mouvements respiratoires de leurs stigmates. Celles-ci sont immédiatement retirées du dispositif d'élevage afin d'éviter une éventuelle contamination des autres individus. Lors du suivi du développement du stade larvaire, nous avons pu mettre en évidence la survenue d'anomalies dont les principales sont des nécroses (Figure 30). L'étendue de celles-ci peut rester stable au cours du développement, mais généralement ces nécroses vont s'étendre et conduire à la mort de l'individu. Ces larves nécrosées sont retirées du dispositif, une fois mortes.



Figure 30 : Larve d'abeille en conditions d'élevage sans traitement présentant des nécroses (tâches noires) 5 jours après greffage.

Chez les larves greffées depuis 8 jours, le redressement et la défécation ont été constatés afin de témoigner de la bonne transition entre le stade larvaire et le stade de pré-nymphe. Après 10 jours, l'apparition de traits caractéristiques du stade adulte a été observée afin d'attester du passage au stade nymphal (Figure 31A, individu à gauche).

A



B

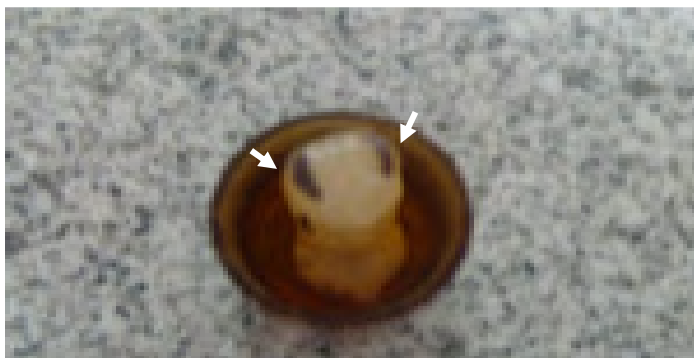


Figure 31 : Larves d'abeille au stade nymphal en conditions normales d'élevage présentant des nécroses et des malformations. (A) A gauche : nymphe aux yeux blancs dont les pattes, désignées par une flèche blanche, sont individualisées ; à droite : nymphe aux yeux blancs pour laquelle la formation des pattes vient juste de débiter. (B) Nymphe aux yeux marrons foncés ne présentant pas un développement normal des pattes, mais avec une pigmentation normale des yeux (flèches blanches).

A ce stade nymphal, des malformations surviennent et se caractérisent par l'absence de pattes (Figure 31A, individu à droite). Ces individus malformés continuent généralement leur développement nymphal, comme l'indique leurs yeux foncés (Figure 31B), mais n'atteignent jamais le stade d'adulte émergent. Les nymphes sont considérées mortes et sont retirées du dispositif d'élevage lorsqu'elles sont affaissées dans la cupule et/ou présentent un retard de développement supérieur à 48 h.

II. CONTROLE DES CONDITIONS D'ELEVAGE LARVAIRE

Le contrôle drastique de la constance des paramètres biotiques et abiotiques de l'élevage larvaire était une étape indispensable à la réalisation de l'étude de la toxicité aiguë et chronique du thymol. Au cours de cette étude, le taux de mortalité larvaire à l'étape du greffage, l'hygrométrie dans les caissons d'élevage et le niveau de contamination de la nourriture larvaire étaient autant de paramètres susceptibles de varier. Ils ont donc fait l'objet d'un contrôle préalable à cette étude.

II.1. Contrôle de la maîtrise de la technique de greffage

La maîtrise de la technique de greffage est longue à acquérir. Il faut compter au moins un mois d'apprentissage pour réussir à limiter les blessures et les traumatismes infligés aux larves au cours de cette étape à leur strict minimum. L'évaluation du degré de maîtrise se fait par la détermination du pourcentage de mortalité à la fin du stade larvaire. Celui-ci ne doit pas excéder 15% selon Aupinel *et al.* (2009). Cette évaluation se déroule en deux étapes qui permettent de contrôler, pour la première la qualité du geste et pour la seconde la capacité du manipulateur à répéter ce geste un grand nombre de fois. Dans cette étude, une troisième étape visant à évaluer une adaptation de la méthode à l'emploi d'un très grand nombre de larves a été ajoutée.

II.2. Contrôle de la qualité du geste de greffage réalisé par le manipulateur

La qualité du greffage réalisé par le manipulateur a été évaluée lorsque celui-ci était effectué sur un petit nombre de larves, c'est-à-dire sans que la fatigue ni le grand nombre de manipulations connexes n'entrent en ligne de compte. Dans ce but, 48 larves au stade L1 ont été greffées dans un dispositif d'élevage contenant pour moitié des cupules en plastique et pour moitié des cupules en cire. Le dispositif a été incubé et les larves nourries selon la méthode décrite précédemment.

II.2.1 Contrôle de la qualité du greffage sur un grand nombre de larves en randomisant les larves à l'échelle de l'ensemble des supports d'élevage

La qualité du greffage a été évaluée dans des conditions identiques à celles rencontrées par le manipulateur lors de la réalisation du test de détermination de la toxicité aiguë du thymol. Pour cela,

288 larves au stade L1 ont été greffées dans 6 dispositifs d'élevage contenant pour moitié des cupules en plastique et pour moitié des cupules en cire. Selon la méthode originelle, les dispositifs d'élevage ont tous été disposés sur la paille et greffés simultanément, en appliquant une homogénéisation de la répartition des individus sur l'ensemble des dispositifs d'élevage et ce, afin de ne pas introduire de biais expérimental *via* la sélection visuelle des larves au cours du prélèvement (Aupinel et *al.*, 2005). La survie larvaire a ensuite été mesurée comme décrit précédemment.

II.2.2 Contrôle de la qualité du greffage sur un grand nombre de larves en randomisant les larves à l'échelle de chaque dispositif d'élevage.

Afin d'évaluer l'effet sur la mortalité larvaire de l'adaptation de la méthode décrite par Aupinel et *al.* (2005) consistant à greffer chaque dispositif l'un après l'autre avec une homogénéisation de la distribution des larves non pas à l'échelle de l'ensemble des dispositifs, mais à l'échelle de chaque dispositif d'élevage, 288 larves au stade L1 ont été greffées dans des cupules en plastique successivement dans les 6 dispositifs d'élevage. Les dispositifs ont ensuite été incubés et la survie larvaire a été mesurée comme décrit précédemment.

II.2.3 Contrôle de l'hygrométrie dans les caissons d'élevage

II.2.3.1 Contrôle du délai d'obtention de l'hygrométrie optimale à l'élevage larvaire

Le délai nécessaire à la saturation en eau de l'air contenu dans les caissons d'élevage après introduction des solutions saturées a été déterminé pour les deux types de caissons : ceux contenant une solution saturée avec des sels de K_2SO_4 , destinés à l'élevage des larves, et ceux contenant une solution saturée avec des sels de NaCl, destinés à accueillir les nymphes en métamorphose. Dans ce but, un récipient contenant un litre de l'une ou l'autre des solutions saturées en sels a été placé dans un caisson d'élevage dans lequel avait été préalablement introduit un hygromètre à cheveux (VWR). L'hygrométrie a ensuite été relevée dans chaque caisson par lecture directe à travers les parois transparentes des caissons 12, 24, 48, 72 et 96 h après fermeture des portes et incubation à 34°C.

II.2.3.2 Contrôle de la cinétique de stabilisation de l'hygrométrie dans les caissons d'élevage après ouverture de la porte.

Le délai nécessaire à la restauration de l'hygrométrie maximale dans les caissons d'élevage a été déterminé après une brève ouverture des portes, nécessaire à la manipulation des supports d'élevage pour le nourrissage et à l'observation des larves et des nymphes. Pour cela, les portes de chaque caisson ont été ouvertes pendant 30 secondes et l'hygrométrie a été mesurée après 15, 30 et 60 min dans les conditions décrites précédemment.

II.2.3.3 *Contrôle du niveau de contamination de la nourriture larvaire*

Les larves sont sensibles à différents agents pathogènes parmi lesquels la bactérie *Paenibacillus larvae*, responsable de la loque américaine, est la plus connue. Les individus les plus sensibles à cette bactérie sont les larves de stade L1 (Evans, 2004) chez lesquelles la bactérie produit une septicémie caractérisée par une activation du système immunitaire qui se traduit par une production 5 fois supérieure au taux de base de l'abaecine et de la défensine (Evans, 2004). D'autres bactéries, y compris des bactéries commensales humaines telles *Escherichia coli*, non pathogène pour la larve d'abeille génèrent également une réponse immunitaire chez les larves (Randolt et al., 2008). La présence de bactéries dans la nourriture larvaire aurait donc été une source de biais potentiel pour l'étude des effets du thymol sur l'immunité larvaire. Le contrôle de l'absence de bactéries dans la nourriture larvaire a donc été un préalable à cette étude.

II.2.3.4 *Contrôle du niveau de contamination de la nourriture larvaire provenant de la ruche et des aliments A, B et C préparés au laboratoire.*

Le niveau de contamination de la nourriture larvaire produite par les nourrices et distribuée aux larves à leur naissance a été déterminé à partir de la gelée royale prélevée sur un cadre de couvain contenant des larves au stade L1 fraîchement nées par ajout de 10 μ L de PBS (pH = 7,4) utilisé ici comme solution d'entraînement, suivi d'une agitation par 10 aspirations et refoulements. La solution a ensuite été diluée dans 90 μ L de PBS, étalée sur une gélose cœur cerveau et incubée à 34°C pendant 48 h avant dénombrement des colonies. Cette manipulation a été répétée 10 fois sur chacune des quatre ruches.

En ce qui concerne le niveau de contamination de l'aliment préparé au laboratoire, celui-ci a été déterminé à partir de 10 μ L d'aliment rapidement décongelés et amenés à température ambiante dilués et incubés comme décrit précédemment. Chaque aliment a été testé en triplicat.

En ce qui concerne le contrôle du niveau de contamination de l'aliment préparé au laboratoire après contact avec une larve, il convient de préciser que les larves ne défèquent pas avant le stade LS, après la consommation totale de la nourriture larvaire. La contamination de la nourriture larvaire par la larve ne peut donc se faire que par contact lors du greffage. C'est la raison pour laquelle le niveau de contamination de l'aliment préparé au laboratoire a été déterminé après que celui-ci a été mis en contact avec une larve au stade L1 prélevée dans une colonie. Pour ce faire, une cupule d'élevage greffée avec une larve au stade L1 déposée sur 50 μ L d'aliments préparés au laboratoire, a été incubée à 34°C et 95% d'humidité pendant 48 h. Dix microlitres de reliquat d'aliment non consommé par la larve ont ensuite été prélevés, dilués et cultivés comme décrit précédemment. Le test a été réalisé en triplicat pour l'aliment A uniquement (le seul en contact avec la larve provenant directement de la colonie) en employant des larves de chacune des quatre colonies.

III. ÉTUDE DE LA TOXICITE DU THYMOL

Le thymol est un composé hydrophobe qui s'accumule sous forme de résidus dans tous les produits de la ruche et particulièrement dans la cire (Bogdanov et *al.*, 1998). Les toxicités aiguë et chronique du thymol sur le développement larvaire ont donc été étudiées selon deux modalités : *via* la cire et *via* la nourriture larvaire. La toxicité aiguë et chronique du thymol a été analysée à travers la détermination de la concentration létale 50 (CL50) dans la cire et dans la nourriture et de la dose létale 50 (DL50) dans la nourriture uniquement. La toxicité chronique du thymol a également été étudiée à travers la mesure de ses effets sublétaux lorsqu'il est présent dans la nourriture. Pour cela, cinq concentrations différentes de thymol ont été employées afin de pouvoir déterminer précisément les CL50 et les DL50. Le choix des concentrations employées a été un compromis basé à la fois sur l'équilibre de la distribution des points autour de la CL50 ou de la DL50 et sur les valeurs du thymol retrouvées dans les conditions environnementales de la colonie. On retrouve ainsi entre 200 à 5000 mg de thymol/kg de cire (Bogdanov et *al.*, 1998 ; Floris et *al.*, 2004) et entre 0,4 à 8,8 mg de thymol/kg de miel (Bogdanov et *al.*, 1998 ; Floris et *al.*, 2004) et entre 0,037 à 39,7 mg de thymol/kg de pollen (Rennish et *al.*, 2011). Les concentrations de thymol employées pour l'étude de la toxicité aiguë de ce composé dans la cire et dans la nourriture ont donc été choisies entre 200 et 5000 mg de thymol/kg de cire et entre 1 et 3000 mg de thymol/kg de nourriture. La mesure des effets sublétaux du thymol sur les individus exposés *via* la nourriture larvaire s'est faite en employant la même gamme de concentrations.

III.1. Exposition au thymol

III.1.1 *Via* la cire

La contamination de la cire a été réalisée par intégration en masse de thymol sans ajout de solvant. Pour cela, des cristaux de thymol (Sigma) ont été simplement introduits dans 20 g de cire préalablement chauffés dans une étuve thermostatée à 65°C jusqu'à liquéfaction totale de façon à obtenir une concentration finale de 200, 500, 1000, 2000 et 5000 mg de thymol/kg de cire. Le mélange a ensuite été agité à l'aide d'un barreau magnétique pendant 3 minutes et employé pour produire des cupules selon la méthode décrite précédemment. Des cupules en cire non contaminées ont été employées comme témoin non-exposé.

III.1.2 *Via* la nourriture larvaire

La nourriture contaminée avec du thymol a été déposée dans les cupules en plastique avant le greffage des larves de façon à ce que ces dernières puissent y être déposées à la surface. Cette nourriture a été très régulièrement renouvelée tout au long de l'élevage et au total 160 µL d'aliment

contaminé ont été consommés par les larves. La contamination de l'aliment s'est faite en deux étapes faisant intervenir l'acétone comme solvant. D'abord, une solution mère à 300 mg de thymol/mL d'acétone a été préparée à l'aide de cristaux de thymol (Sigma) et diluée à différentes concentrations dans de l'acétone pur. Ensuite, les aliments ont été additionnés avec un volume de ces différentes dilutions de façon à introduire 1, 5, 50, 100, 500, 1000 et 3000 mg de thymol/kg d'aliment à une concentration finale en acétone de 1%. Le diméthoate a été choisi comme témoin positif de mortalité et a été employé et préparé de la même façon à une concentration de 0,01 mg/kg d'aliment induisant environ 50% de mortalité 2 jours après greffage. (Aupinel et *al.*, 2009). Des aliments non-contaminés mais additionnés avec 1% d'acétone ont été employés comme témoin solvant et des aliments non-contaminés mais additionnés avec 1% d'eau ont été employés comme témoin de manipulation.

III.1.2.1 Contrôle de l'absence de biais dus aux vapeurs

Dans le but de vérifier l'absence de biais expérimentaux dus aux vapeurs de thymol émanant de la nourriture larvaire ou de la cire vers les individus témoins de manipulation ou témoins solvant présents au sein du même dispositif d'élevage et du même caisson, des dispositifs d'élevage dépourvus de thymol et comportant uniquement des témoins solvant et de manipulation ont été placés dans des caissons d'élevage distincts. Dans le but de faciliter la lecture dans la suite du manuscrit, les témoins solvant contenus dans les dispositifs d'élevage contenant tous les traitements thymol et placés dans les Caissons d'élevage Contaminés avec du Thymol ont été nommés témoins (CCT) et les témoins solvants placés à part dans les Caissons Non-Contaminés avec du Thymol ont été nommés témoins (CNCT).

III.1.2.2 Détermination des effets létaux du thymol

La CL50 du thymol dans la cire et dans la nourriture et la DL50 du thymol dans la nourriture ont été déterminées après une exposition aiguë (2 jours) et chronique (6 jours). Pour cela, la survie de 30 individus exposés à la gamme de concentration en thymol définie précédemment ou placés dans les différents témoins a été enregistrée quotidiennement comme décrit précédemment.

III.1.2.3 Détermination des effets sublétaux du thymol

▪ Prélèvements et détermination de la croissance pondérale

L'étude des effets sublétaux du thymol dans la nourriture larvaire contaminée a été réalisée au travers de la mesure de la croissance pondérale, de l'expression de gènes d'intérêt et de l'activité enzymatique sur des individus prélevés 1, 6, 8 et 10 jours après greffage. Cette chronologie a été choisie pour les raisons suivantes : une forte mortalité larvaire a été observée au stade L1 (1 jour) après les traitements des ruches au thymol (Mattila et *al.*, 2000 ; Imdorf et *al.*, 1995) ; le stade larvaire se

termine 6 jours après le greffage, les larves ont alors consommé toute la nourriture ; huit jours après greffage, les larves sont au stade prénympe alors qu'après 10 jours, les individus sont passés au stade nymphe aux yeux blancs et commencent à prendre une forme adulte. Chaque prélèvement, constitué de huit individus exposés à 1, 5, 50, 100, 500 ou 1000 mg de thymol/kg d'aliment ou élevés dans les témoins, a été réalisé de façon aléatoire au travers de l'ensemble des dispositifs d'élevage selon une séquence préalablement définie à l'aide de la fonction *random* du tableur Excel. Une fois prélevés, ils ont été extraits des cupules d'élevage, pesés à l'aide d'une balance Sartorius TE124S (Fisher, Scientif), transférés dans des tubes Eppendorf® de 1,5 mL (VWR), congelés à -80°C et conservés à cette température jusqu'à analyse.

- Quantification des ARN messagers par PCR en temps réel

La PCR en temps réel est une technologie qui couple un thermocycleur et un détecteur de fluorescence afin de mesurer en continu la quantité d'amplifia présent dans un échantillon en cours d'amplification. Dans la technique employée dans cette étude la quantification est réalisée par la mesure de la fluorescence du SYBR Green, un intercalant de l'ADN, pendant la phase de renaturation. La détermination de la quantité d'ADN qui était présente à l'origine dans le tube dans la méthode dite de quantification absolue, repose sur l'analyse à l'aide d'un logiciel adapté, de la courbe sigmoïde obtenue après amplification. L'analyse mathématique de cette courbe, dont le tracé comporte une portion linéaire ayant pour origine l'entrée en phase exponentielle de la réaction de polymérisation, permet de définir un cycle seuil à partir duquel la réaction est entrée en phase exponentielle. Dans des conditions données, le nombre de cycles de polymérisation qu'il est nécessaire d'accomplir pour atteindre ce cycle seuil est lié par une constante à la quantité d'ADN présente initialement dans le tube. Il suffit donc d'employer une gamme de calibration pour pouvoir déterminer la quantité d'ADN présent dans un échantillon donné. Lorsque cette technologie est utilisée pour quantifier le nombre de copies d'un ARN messenger (ARNm) spécifique, celui-ci doit au préalable avoir été rétrotranscrit en ADN complémentaire. De même, la gamme de calibration doit au préalable avoir été construite. Les variations d'expression des gènes d'intérêts sont évaluées par rapport à des gènes de référence, dont l'expression ne varie pas en fonction des facteurs étudiés.

- Choix des gènes

L'analyse quantitative de l'expression des gènes par RT-PCR en temps réel est une méthode alternative aux techniques onéreuses de puces à ADN souvent utilisées pour l'étude du transcriptome. Cette technique plus ciblée, s'adresse à un nombre limité de gènes préalablement sélectionnés. Ainsi, l'intérêt de cette technologie répond plus à une volonté d'évaluation précise de marqueurs moléculaires qui seraient impliqués dans un contexte donné. Si cette technique s'est avérée efficace et rapide, sa fiabilité est compromise par le choix du gène de référence approprié. Le choix des gènes

d'intérêt et des gènes de référence a été basé sur les données disponibles dans la littérature. Deux gènes de ménage, candidats pour la normalisation de l'expression de 6 gènes d'intérêt marqueurs de l'immunité et du développement ont été choisis.

— *Choix des gènes de référence*

Un gène de référence est un gène dont la constance de l'expression permet la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt et la comparaison des niveaux d'expression de ces gènes à différents stades de développement et pour différents traitements. Il est souvent difficile de trouver un gène dont l'expression est parfaitement constante quelles que soient les conditions. Le gène de référence employé dans cette étude devait cependant être exprimé de façon constante tout au long du développement larvaire et ne pas varier lorsque l'individu est soumis à une intoxication par le thymol. Ainsi, les gènes de l'actine et de la protéine ribosomale 49 ont été choisis comme gènes de référence candidats parmi ceux décrits dans la littérature pour être exprimés de façon constante au cours du développement larvaire et lors d'une exposition à un composé toxique (Lourenço et *al.*, 2008 ; Evans, 2004 ; Boncristiani et *al.*, 2012). Des études antérieures ont remis en question l'utilisation des gènes de référence dits 'classiques' tels que les gènes de la glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogénase et de l'actine comme marqueurs de référence (Radonic et *al.*, 2004) ; du fait que leur transcription est significativement variable entre les différents tissus et protocoles expérimentaux. Une étude portant sur le choix de gènes de référence en fonction de la nature de l'expérimentation est donc un prérequis pour la fiabilité et la reproductibilité des études de l'expression différentielle de gènes d'intérêt (Lourenço et *al.*, 2008).

— *Choix des gènes marqueurs de l'immunité et du développement*

Les gènes marqueurs de l'immunité et du développement choisis sont les gènes de l'abaecine, du lysozyme, de la phénol oxydase, de la serpine-5, de la protéase à sérine 14 et de la vitellogénine.

L'abaecine est un peptide antimicrobien jouant un rôle majeur dans l'immunité de la larve (Evans, 2004). Il est par exemple produit dès les premiers stades larvaires au cours de l'infection par *Paenibacillus larvae* (Evans, 2004). La transcription de ce gène est régie par des activateurs de transcription situés en aval à la fois de la voie Toll et de la voie IMD (Evans et *al.*, 2006 ; Hoffmann, 2003). Ce gène a donc été choisi comme marqueur de l'immunité effectrice non enzymatique en accord avec (Yang & Cox-Foster, 2005).

Le lysozyme est impliqué dans l'immunité cellulaire, en particulier dans la destruction des membranes bactériennes. Mais, il joue également un rôle dans le contrôle de la fermentation durant la digestion (Hultmark, 1996). Lors d'un contact avec un pathogène, le Lysozyme est coexprimé avec d'autres peptides antibactériens (Daffre et *al.*, 1994 ; Kanost et *al.*, 2005). La phénol oxydase est une enzyme clé de la coagulation de l'hémolymphe. Elle est synthétisée sous forme de proenzyme : la

prophénol oxydase. Elle joue un rôle de premier plan dans l'immunité larvaire à travers la production de peroxyde d'hydrogène (Gillespie et *al.*, 1997 ; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). La protéase à sérine 14 est une enzyme plasmatique sécrétée de manière inactive et impliquée dans l'activation de la voie Toll et de la prophénol oxydase (Zou et *al.*, 2006 ; Buchon et *al.*, 2009). La serpine 5 est une enzyme inhibitrice des protéases à sérine. C'est un répresseur de la voie Toll dont le rôle essentiel est anti-inflammatoire (Zou et *al.*, 2006). Enfin, la vitellogénine est une glycoprotéine ayant un rôle pléiotropique. Elle est impliquée dans la croissance, la fécondité et le temps de vie des abeilles (Guidugli et *al.*, 2005a ; Amdam et *al.*, 2006 ; Nelson et *al.*, 2007).

▪ Extraction des ARN totaux

L'ARN total a été extrait à l'aide de TRI-reagent[®] (Sigma) en suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, les larves préalablement stockées à -80°C ont été broyées à l'aide d'un pilon dans un tube Eppendorf[®] de 1,5 mL dans 400 µL de TRI-reagent[®]. Les homogénats ont été incubés pendant 5 minutes à température ambiante afin de dissocier les complexes nucléoprotéiques, puis séparés par l'ajout de 80 µL de chloroforme suivi de 15 minutes d'incubation et d'une centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes à 4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN total, située au-dessus de l'interphase contenant l'ADN et de la phase phénolique contenant les protéines, a été transférée dans un nouveau tube. L'ARN total a ensuite été précipité par l'ajout de 200 µL d'isopropanol (Sigma) et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 8000 g pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN total a été lavé deux fois par ajout d'alcool à 75° suivi d'une centrifugation à 8 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après séchage à l'air libre, l'ARN total a été resuspendu dans 30 µL d'eau MilliQ stérile, la pureté et la quantité obtenues de l'ARN total ont été contrôlées à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan infinite M200[®] en mesurant le rapport d'absorbance à 260 et 280 nm. La qualité de l'ARN total a quant à elle été contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% à l'aide du marqueur de taille PCR Marker[®] (Sigma) contenant 8 fragments de 50 à 2000 pb. La migration a été effectuée à 120 V pendant 30 minutes à l'aide de l'appareil d'électrophorèse Labnet gel[®] XL ultra V-2 (VWR). Le marquage des bandes d'ADN a été effectué par trempage dans un bain de bromure d'éthidium à 5 mg/L (Sigma) suivi d'un rinçage dans un bain d'eau distillée. Les bandes ont été visualisées à l'aide de l'analyseur de gel rainbow CCTV RMB92 (Fisher bioblockscientific). L'ARN total obtenu a été utilisé immédiatement pour prévenir son éventuelle dégradation.

▪ Synthèse des ADN complémentaires par rétrotranscription

La rétrotranscription est l'opération qui permet d'obtenir en un seul cycle d'amplification un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARN messenger (ARNm). L'utilisation d'amorces aléatoires sous forme d'hexamères permet de transcrire l'ensemble des ARNm. Dans cette

étude, la rétro transcriptase AMV-RT[®] (Sigma) a été choisie pour sa capacité à synthétiser de longs fragments d'ADNc grâce à sa forte affinité pour l'ARNm qui lui permet de franchir les structures secondaires sans se détacher. Tout d'abord, 2 µg d'ARN total ont été mélangés à 0,2 µg de pDN6[®], 10 nmol de dNTPs et 2 µL de tampon réactionnel 10 x dans un volume réactionnel de 20 µL (tous provenant de Sigma). La linéarisation des brins d'ARN total a ensuite été réalisée pendant 10 minutes à 70°C et la réassociation a été inhibée en plongeant la solution immédiatement dans la glace. Après 5 min d'incubation, l'hybridation des amorces a été réalisée pendant 15 minutes à 25°C puis 20 unités d'AMV-RT[®] (Sigma) ont été ajoutées et la rétrotranscription a été réalisée à 45°C pendant 50 minutes. Afin de contrôler l'absence de toute amplification non spécifique, un témoin négatif sans rétrotranscriptase a été inclus dans chaque lot d'ARN total rétrotranscrit. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

■ Élaboration des gammes de standards

Les standards sont obtenus par insertion unique d'un fragment d'ADN d'intérêt dans un plasmide bactérien utilisé ici comme vecteur. La quantité molaire de vecteur inséré est ainsi égale à celle de l'insert spécifique. La précision du calcul du nombre de copies de l'insert, en relation avec le nombre d'Avogadro¹, par mesure de l'absorbance s'en trouve alors grandement améliorée puisque la masse du standard ainsi formé est environ dix fois supérieure à celle de l'insert seul. Une gamme de calibration précise peut alors être effectuée par dilution de raison dix du vecteur inséré allant de 10⁹ à 10¹ copies. L'obtention de standards se déroule en plusieurs phases. D'abord un fragment d'ADNc d'une taille comprise entre 200 et 400 paires est polymérisé à partir d'un rétrotranscrit d'un gène d'intérêt. Ensuite, ce fragment est inséré dans un plasmide qui sera cloné dans une bactérie et purifié.

— *Amplification des fragments de gènes d'intérêt*

L'amplification des fragments d'intérêt a été réalisée par PCR à partir d'ADNc à l'aide d'amorces spécifiques dont les séquences ont été publiées antérieurement ou dessinées à l'aide du logiciel OligoArchitect[™] (Sigma) (Tableau 7). Brièvement, 1 µL d'ADNc a été mélangé à 0,5 µmol d'amorces sens et anti-sens de l'abaecine, du lysozyme, de la phénol oxydase, de la serpine-5, de la protéase à sérine 14, de la vitellogénine et de deux référents qui sont l'actine et la protéine ribosomiale 49 (RP-49), 0,01 unités de Taq polymérase et 2 mmol de dNTPs dans un volume réactionnel de 50 µL (Tout provenant de Sigma).

La réaction de polymérisation a été réalisée selon le programme suivant : une dénaturation à 95°C pendant 10 min, 39 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 s, 59°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min et une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

¹ Nombre d'Avogadro : $N_A = 6,02214129(27) \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

Tableau 7 : Séquences des amorces employées pour l'amplification des fragments des gènes d'intérêt et des gènes de référence.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Référence dans GenBank	Référence
<i>Gènes de référence</i>				
Actine	ATGCCAACACTGTCC TTTCTGGAGGTA	AGGAATGGAAGCTTG CGGTA	AB023025	Chen et <i>al.</i> , 2005
Protéine ribosomale 49	TGATAACAGAGTTC GTAGAC	TTGAGCACGTTCAACA AT	CG7939	Dessinées au cours de cette étude
<i>Gènes d'intérêt</i>				
Abaecine	GCGGCCGCTCGGATT GAATGGTCCCTGA	GCGGCCGCAGATCTGC ACACTCGAGGTCTG	AF442147.1	Yang & Cox-Foster, 2005
Lysozyme 1	ACACGGTTGGTCACT GGTCC	GTCCCACGCTTTGAAT CCCT	XM_003249626.1	Yang & Cox-Foster 2005
Protéase à sérine 14	GATTACCCAATGGC ATCGAC	GCTGGTGAACCGCAA GTATT	GB14044	Zou et <i>al.</i> , 2006
Serpine 5	ACTCAGCGAACCGA TTATGG	GGACAGCATTTGGATT CGTT	GB19582	Zou et <i>al.</i> , 2006
Prophénol oxydase (rpn3)	GCGGCCGCTAATCTT CCAATAATTCATAC GCTCTT	GCGGCCGCAATCCATT ACCTGAAATTGATGCT TAT	LOC551550	Yang & Cox-Foster, 2005
Vitellogénine	CCGACGAGGACCTG TTGATTA	CTAGGATACGTGGTCA TGACA	CAD56944	Koywiwattrakul et <i>al.</i> , 2005

— Purification des inserts

La taille des amplifias obtenus a été contrôlée et ceux-ci ont été purifiés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% selon la méthode décrite précédemment. Les bandes d'intérêt ont été visualisées à l'aide de l'analyseur de gel rainbow CCTV RMB92 (Fisher bioblockscientific), découpées à l'aide d'une lame de scalpel stérile (VWR) et purifiées à l'aide de la trousse GenElute® Agarose Spin Column (Sigma) selon le protocole du manufacturier.

— Clonage des inserts

Le plasmide pGEM®-T EasyVector (Promega) a été choisi pour sa grande facilité d'utilisation et pour son double système de sélection. Ce plasmide (Figure 32) est vendu ouvert et ses extrémités se terminent par une thymine libre. Les inserts eux, ont été produits de façon à ce que la dernière élongation de la réaction de polymérisation soit suffisamment longue pour permettre à la polymérase d'ajouter une adénine libre aux amplifias. Ainsi le rendement de la ligation s'en trouve grandement

amélioré et l'élimination des plasmides non insérés facilitée. Ce plasmide contient également un gène de résistance à l'ampicilline et une région à site multiple de clonage insérée dans le gène de la β -galactosidase de sorte que son expression soit impossible ou non significative lorsqu'un fragment d'intérêt y est inséré.

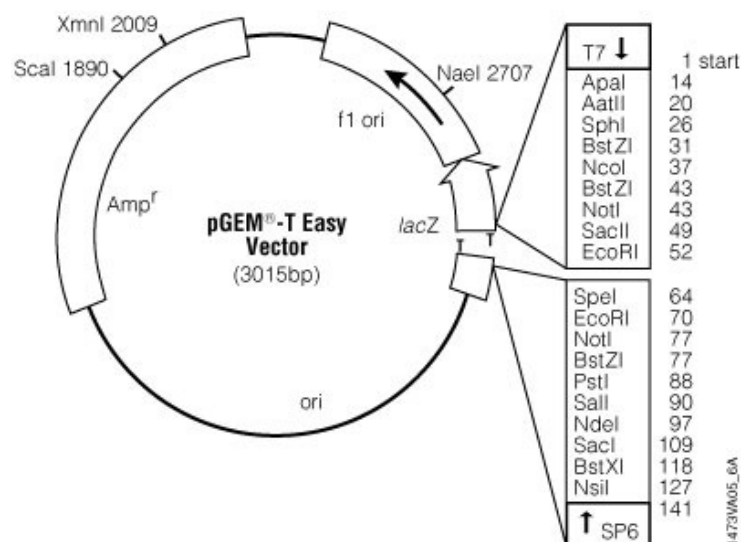


Figure 32 : Carte du plasmide pGEM®-T EasyVector (Promega).

Ainsi, les bactéries transformées par le plasmide inséré sont aisément identifiées après une double sélection basée sur la résistance à l'ampicilline et l'absence d'activité β -galactosidase. Ce plasmide a été recombiné avec les inserts selon le protocole du manufacturier et transformé dans des bactéries compétentes JM109 (Promega) sélectionnées après culture sur milieu sélectif en présence d'indicateur coloré. Brièvement, 2 ng d'insert ont été mélangés avec 50 ng de vecteur pGEM®-T (Promega) en proportion molaire de 1 pour 1 et 50 unités de ligase T4 (Proméga) dans un volume réactionnel de 10 μ L. La réaction s'est déroulée pendant 12 h à 4°C. Environ 10^8 bactéries compétentes *E. coli* JM109 (Sigma) ont été transformées avec 10^{13} copies du plasmide à 42°C pendant 40 s. Les bactéries transformées ont ensuite été immédiatement plongées dans la glace et incubées dans 1 ml de milieu liquide LuriaBertani (LB ; Merck) pendant 2 h à 37°C sous agitation douce. Les bactéries transformées ont enfin étéensemencées en nappe une gélose LB additionnée de 1 μ g/ml d'ampicilline et de 10 μ L d'une solution blue white® (Sigma) contenant de l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à 40 g/L et 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal) à 40 g/L et incubée pendant 24 h à 37°C.

— *Purification des standards*

Les colonies blanches formées par les bactéries ayant intégré le plasmide recombiné ont été prélevées et cultivées dans 5 mL de LB additionné de 1 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant 4 h à 37°C et 250 rpm. Les plasmides ont ensuite été purifiés à l'aide de la trousse GenElute™ HP PlasmidMiniprep Kit (Promega) et quantifiés par spectrophotométrie comme décrit précédemment.

— *Élaboration des gammes de calibration par PCR en temps réel*

Une série de dilution de raison dix allant de 10^1 à 10^9 copies/µL a été réalisée en dupliquât. Les gammes de calibration des courbes de standards ont été réalisées dans des capillaires (Roche) par PCR en temps réel à l'aide d'un LightCycler® (Roche Diagnostic) et de la trousse FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Master Mix® selon le protocole du fabricant. Brièvement, 0,5 µL de chacune des dilutions a été mélangé à 10 µmoL d'amorces sens et anti-sens (Sigma) de l'abaecine, du lysozyme, de la phénol oxydase, de la serpine5, de la protéase à sérine 14, de la vitellogénine et de deux référents : l'actine et RP-49 (Tableau 7) et à 4 µL de FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Master Mix® (Roche Diagnostic) dans un volume réactionnel final de 10 µL. L'amplification a été réalisée selon le programme suivant : une dénaturation à 95°C pendant 10 min suivie de 32 cycles d'amplification à 95°C pendant 30 s, 59°C pendant 1 min et 72°C pendant 1 min. Les mesures ont été réalisées avec correction automatique en temps réel des erreurs sur la base de la stabilité de fluorescence de la 6-carboxy-x-rhodamine, un fluorochrome non lié ajouté au mélange réactionnel par le fabricant (Roche). La qualité des amplifiats a été contrôlée à l'aide d'une cinétique de dissociation qui a été programmée après la polymérisation et débutait à 95°C pour atteindre 40°C à une vitesse de 2°C/s.

▪ Quantification par PCR en temps réel

L'ADN complémentaire de l'ARNm de l'abaecine, du lysozyme, de la phénol oxydase, de la serpine 5, de la protéase à sérine 14, de la vitellogénine et de deux référents : l'actine et de RP-49, a été amplifié en dupliquât par PCR en temps réel selon la méthode décrite précédemment. Un standard externe d'une concentration de 1×10^5 copies/µL et le témoin négatif ont été ajoutés en dupliquât à chaque analyse. Lorsque la différence entre les quantités d'ADN mesurées dans les deux répliquâts n'excédait pas 10%, la moyenne de ces deux mesures a été employée comme concentration de l'échantillon. Dans le cas contraire, les échantillons ont été réanalysés. Enfin, une électrophorèse en gel d'agarose 1% a été réalisée et la taille des amplifiats et l'absence de bande contaminante a été contrôlée.

III.1.2.4 Mesure des activités enzymatiques

L'activité d'enzymes marqueurs de l'immunité et du développement larvaire a été mesurée à tous les stades excepté au 1^{er} jour après le greffage, stade auquel les larves sont trop petites pour pouvoir réaliser ce type de mesure sans grouper les individus.

▪ Choix des enzymes

Des marqueurs de l'immunité cellulaire, du développement et de l'activité du système de détoxification ont été choisis parmi les enzymes produites à tous les stades du développement larvaire afin de déterminer l'effet du thymol sur l'activité de ces marqueurs. Le choix de ces enzymes marqueurs a été basé sur les données bibliographiques. Ainsi, Yang & Cox-Foster, (2005) ont défini 4 marqueurs qui sont la phénol oxydase, le lysozyme, la glucose déshydrogénase et la glucose oxydase. L'activité de tous ces marqueurs, sauf celle de la glucose oxydase qui est nulle chez la larve, a été étudiée. Le lysozyme est un marqueur de l'immunité cellulaire dont le rôle est de détruire la paroi des bactéries (Hultmark, 1996). La glucose déshydrogénase et la phénol oxydase sont à la fois des marqueurs de la réponse cellulaire (Cox-Foster et al., 1990 ; Lavallo & Cox-Foster, 1999 ; Decker & Jaenicke, 2004) et des marqueurs du développement larvaire *via* la production de L DOPA impliquée dans la mélanisation de la cuticule (Prota, 1992). L'activité de la Glutathion S-transférase impliquée dans la phase II du processus de détoxification a été choisie comme marqueur de l'activité du système de détoxification (Badiou-Bénéteau et al., 2012).

▪ Extraction des protéines totales

Les protéines totales ont été extraites des individus prélevés selon la méthode de Yang & Cox-Foster, (2007). Brièvement, les individus ont été broyés à l'aide d'un piston (VWR) dans 500 µL de tampon Tris HCl (pH = 7) 0,1M à 4°C, les broyats ont été centrifugés à 14 000 g pendant 30 min à 4°C et les surnageants ont été collectés et conservés à -20°C.

▪ Quantification des protéines

La concentration protéique des surnageants a été déterminée à l'aide du réactif de Bradford (Sigma) en suivant le protocole du fabricant (Bradford, 1976).

— *Mesure de l'activité de la glutathion S-Transférase*

L'activité de la glutathion S transférase a été mesurée selon la méthode de Habig et al. (1974). Brièvement, 20 µL de broyat ont été transférés dans 180 µL de tampon K₂HPO₄/KH₂PO₄ (Sigma) 0,1 M (pH = 7,4) additionné de 1 mM d'EDTA (Panreac) et de 1 mM de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (Sigma). La réaction a été déclenchée en ajoutant 5 mM de glutathion réduit (Sigma) et l'activité de la glutathion S-transférase a été mesurée à une longueur d'onde de 340 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan infinite M200®.

— *Mesure de l'activité du lysozyme*

L'activité du lysozyme a été déterminée selon la méthode de Newton et *al.* (2004). Brièvement, 15 µL de broyat ont été transférés dans 185 µL de tampon Tris HCl 0,1 M (pH = 7) additionnés de 0,1 mg/L de 4-Nitrophenyl B-D-N,N',N''-triacetylchitotriose (Sigma) et une cinétique enzymatique a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Tecan infinite M200® à une longueur d'onde de 415 nm pendant 20 min.

— *Mesure de l'activité de la phénol oxydase*

L'activité de la phénol oxydase a été déterminée selon la méthode décrite par Merckx-Jacques & Bede, (2005). Brièvement, 15 µL de broyat ont été transférés dans 185 µL de tampon Tris HCl 0,1 M (pH = 7) additionné de L DOPA (Sigma) à 0,02 M et une cinétique enzymatique a été réalisée comme décrit précédemment à une longueur d'onde de 490 nm pendant 40 min.

— *Mesure de l'activité de la glucose oxydase*

L'activité de la glucose oxydase a été déterminée selon la méthode de Merckx-Jacques & Bede, (2005). Brièvement, 10 µL de broyat ont été transférés dans 190 µL de tampon PBS (Sigma) 0,2 M (pH = 6) additionné de 0,1 M de glucose (Merck) et de 25 µg/mL d'horseradishperoxidase (Sigma). La réaction a été déclenchée par l'ajout de 30 µL d'o-dianisine (Sigma) à 5 µg/mL et une cinétique enzymatique a été réalisée comme décrit précédemment à une longueur d'onde de 460 nm pendant 20 min.

— *Mesure de l'activité de la glucose déshydrogénase*

L'activité de la glucose déshydrogénase a été mesurée selon la méthode décrite par Lovallo & Cox-Foster, (1999). Brièvement, 10 µL de broyat ont été transférés dans 190 µL de tampon TrisHCl 0,1 M (pH = 6,8), additionné de 48 µM de 2,6 dichlorophenolindophenol et de 150 mM de D-glucose. Une cinétique enzymatique a été réalisée comme décrit précédemment à une longueur d'onde de 600 nm pendant 1 min.

IV. ANALYSES STATISTIQUES

Les données statistiques ont été analysées à l'aide du logiciel R2.7.0, un logiciel en ligne gratuit, utilisable sur différentes plates-formes, accessibles à tous et en perpétuelle évolution (CRAN, R-Project). Le travail a été effectué sous la direction technique du Professeur Jean-Baptiste Ferdy au sein du laboratoire Évolution et Diversité Biologique de Toulouse.

IV.1. Détermination de la toxicité aiguë et chronique du thymol

Dans un premier temps, l'absence de différence entre les taux de survies dans les différents témoins a été vérifiée en ajustant des modèles linéaires généralisés (glm) dans lesquels le témoin manipulation placé dans le caisson non contaminé avec des vapeurs de thymol a servi de témoin. Dans un deuxième temps, la mortalité corrigée a été calculée en soustrayant la mortalité dans le groupe témoin CCT à celle enregistrée dans les groupes exposés à différentes concentrations en thymol. L'effet du thymol sur la survie a été déterminé en ajustant les données à l'aide du modèle linéaire de survie *Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data*, disponible dans la librairie *Surv* (CRAN, R-Project), en incluant un potentiel effet répliquat qui a permis l'établissement d'une corrélation linéaire entre la survie des individus et le temps en prenant le témoin CCT comme référence (Fox, 2002). Chacun de ces modèles a été analysé avec la fonction *Survdiff* de la famille des tests G-rho, disponible dans la librairie *Surv*, qui a permis de déterminer l'effet des variables solvant, caisson et thymol sur la survie.

IV.2. Détermination de la CL50 et de la DL50

Les CL50 ont été calculées selon la méthode de Fieller (Niu et al., 2010) Brièvement, les CL50 du thymol aiguë et chronique, ont été analysées à l'aide de la fonction *dose.p* disponible dans la librairie *MASS* sur le jeu de données ajusté à l'aide d'un glm disponible dans la librairie *stats* (CRAN, R-Project), dont les paramètres étaient les suivants : une variable à expliquer, la mortalité, une variable explicative, la concentration en thymol exprimée en logarithme base dix, le type de loi utilisée pour l'ajustement, la loi binomiale et la fonction de lien, la fonction *logit*.

IV.3. Détermination du nombre d'individus à prélever pour la mesure des effets sublétaux du thymol

Le nombre d'échantillons à prélever afin de déterminer les effets du thymol sur le poids des larves, sur l'expression des gènes d'intérêt et sur l'activité enzymatique a été calculé à l'aide de la fonction *pwr.anova.test* disponible dans la librairie *pwr* (CRAN, R-Project) en paramétrant le test de la façon suivante : sept groupes à analyser, seuil de rejet α de l'hypothèse H_0 d'absence d'effet : 0,05, puissance minimale du test : 0,8 et taille d'effet fort : 0,4.

IV.4. Détermination de l'effet du thymol sur la croissance pondérale

L'effet du thymol sur la croissance pondérale des larves a été déterminé à l'aide du test de Kruskal-Wallis, un test de rang, non paramétrique autorisant la comparaison simultanée de plusieurs groupes basés sur l'analyse de la dissimilarité des variances. L'ensemble des données de poids

obtenues dans les groupes d'individus exposés au thymol a été comparé aux données obtenues dans le groupe témoin CCT afin de déterminer s'il existait un effet thymol. Lorsqu'un effet a été observé, les données pondérales obtenues pour chacun des groupes d'individus exposés à une dose de thymol et celles obtenues dans le groupe témoin CCT ont été comparées deux à deux afin de déterminer quelles doses étaient responsables de l'effet observé.

IV.5. Détermination de l'effet du thymol sur l'expression génique et l'activité enzymatique

La détermination de l'effet du thymol sur l'expression génique et sur l'activité enzymatique chez les individus exposés a été réalisée en suivant scrupuleusement les mêmes démarches. Le jeu de données a été ajusté à l'aide d'un glm disponible dans la librairie *stats* (CRAN, R-Project), paramétré de la façon suivante : une variable à expliquer, le logarithme base dix de l'expression d'un gène normalisée sur l'expression du gène de ménage RP 49, ou l'activité d'une enzyme normalisée sur le taux de protéines ; une variable explicative, la concentration en thymol exprimée en logarithme base dix ; une interaction entre l'effet du thymol, le stade de développement et le répliquât ; l'ajustement à l'aide de la loi gaussienne. Le test de Shapiro réalisé avec la fonction *shapiro.test* disponible dans la librairie *stats*, ainsi qu'une analyse graphique des résidus réalisée avec la fonction *residuals* disponible dans la même librairie, ont été employés afin de déterminer si la linéarisation des données était effective. Dans ce cas, une analyse de variance a été réalisée à l'aide du test *anova.test* disponible dans la même librairie afin de déterminer l'effet du thymol sur l'expression des gènes ou l'activité des enzymes étudiées. Dans le cas contraire un autre modèle de linéarisation appelée *generalized linear mixed model* (glmer) a été ajusté sur le jeu de données en employant le même paramétrage que dans le glm mais avec cette fois-ci la possibilité de mettre le facteur répliquat en effet aléatoire. La linéarisation des données a été contrôlée comme décrit précédemment et lorsque celle-ci a réussi, l'analyse des données a été réalisée à l'aide d'une analyse de la variance (ANalysis Of Variance, ANOVA). Dans les cas où un effet du thymol a pu être détecté, le test de Kruskal-Wallis a été employé afin de déterminer à quels stades développementaux et pour quelles concentrations en thymol l'expression génique ou l'activité enzymatique variait de façon significative. Parfois aucun modèle linéaire n'a pu être ajusté. En d'autres termes, la part de la variation des données non expliquées après leur linéarisation dépassait le seuil permettant de qualifier cette variation de « résiduelle ». C'est malheureusement souvent le cas pour les jeux de données dans lesquels un grand nombre de variables interviennent, elles-mêmes parfois en interaction, comme c'est le cas dans cette étude (Hendriksma et al., 2011). Dans ces circonstances particulières, l'étude statistique n'a pas pu être réalisée sur l'ensemble du jeu de données. Ces données ont alors été analysées à l'aide du test de Kruskal Wallis et

les analyses se sont limitées à une détermination de l'effet du thymol sur l'expression génique ou l'activité enzymatique stade par stade.

RESULTATS

I. CONTROLE DES CONDITIONS D'ELEVAGE LARVAIRE

L'élevage *in vitro* des larves d'abeille est la pierre angulaire de cette étude. De l'optimisation et de la répétabilité des conditions d'élevage dépendait directement la validité des résultats obtenus au cours de ce travail. Pour cette raison, deux points-clés de cet élevage ont fait l'objet d'une attention toute particulière. Le premier point est le contrôle des paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement larvaire que sont la température, l'hygrométrie et les propriétés nutritives de la nourriture. Le deuxième point est la maîtrise de la technique de greffage. La validation de la maîtrise de ces aspects a donc constitué un préalable à cette étude.

I.1. Contrôle de l'hygrométrie dans les caissons d'élevage

La mesure de l'hygrométrie dans les caissons d'élevage après introduction des solutions saturées en sels de K_2SO_4 ou de $NaCl$ a permis de déterminer le temps de latence nécessaire pour atteindre l'hygrométrie optimale. De même, la cinétique d'équilibration de l'hygrométrie dans ces caissons après ouverture de la porte a permis de déterminer le temps maximal d'ouverture des portes. Les résultats montrent que l'hygrométrie ciblée est atteinte après 48 h d'incubation à 34°C et reste stable dans le temps (Tableau 8). Ils mettent également en évidence la nécessité d'employer deux caissons hermétiques distincts pour assurer la transition entre la fin du stade larvaire et la nymphetion.

Tableau 8 : Hygrométrie mesurée dans les caissons en fonction du temps après introduction des solutions saturées en sels.

Temps (heures)	Hygrométrie en %	
	Caisson NaCl	Caisson K_2SO_4
0	10 ± 2	10 ± 2
12	58 ± 5	64 ± 5
24	72 ± 6	92 ± 7
48	76 ± 7	95 ± 7
72	78 ± 7	96 ± 6
96	75 ± 9	93 ± 8

Cette hygrométrie chute brutalement après ouverture de la porte, par exemple lors du nourrissage de larves. Mais les résultats indiquent que lorsque cette ouverture ne dépasse pas 30 s, environ 92% de l'hygrométrie initiale est rétablie après seulement 15 min (Tableau 9). Ce résultat indique que l'effet de cette brève ouverture sur la survie larvaire est négligeable en comparaison aux 5 min passées par les larves en dehors du caisson d'élevage lors du nourrissage.

Tableau 9 : Hygrométrie mesurée dans les caissons en fonction du temps après 30 secondes d'ouverture des solutions saturées en sels.

Hygrométrie en %		
Temps (minutes)	Caisson NaCl	Caisson K ₂ SO ₄
0	59 ± 5	75 ± 4
15	71 ± 5	88 ± 5
30	75 ± 5	93 ± 5
60	77 ± 4	95 ± 6

I.1. Contrôle du niveau de contamination de la nourriture larvaire

Le niveau de contamination de l'aliment préparé au laboratoire a été comparé avec celui de la nourriture donnée aux larves par les nourrices. Pour compléter cette étude, la contamination de l'aliment suite au transfert des larves de la ruche vers les cupules contenant de l'aliment a également été vérifiée.

Aucune bactérie n'a pu être revivifiée après culture de la nourriture distribuée par les nourrices sur gélose nutritive cœur cervelle. Le même résultat a été obtenu pour la culture de l'aliment A préparé au laboratoire. De même, le transfert des larves de la ruche vers les cupules ne semble pas avoir contaminé l'aliment même après 48 heures de développement larvaire. Ce résultat est à mettre en lien avec les propriétés antibiotiques de la gelée royale (Fujiwara et *al.*, 1990 ; Sauerwald et *al.*, 1998) dont la présence à la fois dans l'aliment préparé au laboratoire à 50% et dans la nourriture provenant des nourrices, pourrait expliquer l'asepsie de ces deux aliments. L'absence de bactérie revivifiable dans l'aliment 48 h après greffage semble étayer cette hypothèse.

I.1. Contrôle de la maîtrise de la technique de greffage

Le greffage est une étape clé de l'élevage larvaire selon la méthode développée par Aupinel et *al.* (2005). La technique est considérée comme maîtrisée lorsque le pourcentage de mortalité à la fin du stade larvaire n'excède pas 15%. Afin de vérifier que ce pourcentage ne serait pas dépassé au cours de l'étude à la fois en cupules plastiques et en cupules de cire, la capacité du manipulateur à maîtriser le greffage a été évaluée en deux étapes : la première visant à évaluer la qualité du geste et la seconde visant à évaluer la capacité du manipulateur à effectuer ce geste sur un grand nombre de larves.

Les résultats du contrôle de la maîtrise du geste indiquent que la mortalité à la fin du stade larvaire dans les cupules en plastique et dans les cupules de cire est respectivement de 4 et 8 %. Après 14 jours de développement, soit au milieu du stade nymphal, la mortalité atteint respectivement 6 et 13

% (Tableau 10A). Ces résultats ont permis de valider la maîtrise de la technique de greffage à proprement parler puisque le seuil de 15 % n'a pas été atteint. Les résultats du contrôle du greffage lorsque l'homogénéisation des individus a été réalisée à l'échelle de l'ensemble des dispositifs d'élevage montrent que la mortalité atteint 26 et 28 % à la fin du stade larvaire lorsque les individus ont été greffés dans des cupules en plastique ou en cire respectivement (Tableau 10B). L'élevage a donc été arrêté à ce stade car le seuil de 15 % à la fin du stade larvaire avait alors été largement dépassé. Ces résultats montrent que cette technique de greffage, bien qu'optimale pour la randomisation des groupes est inadaptée à l'élevage d'un grand nombre de larves.

Les résultats obtenus pour les larves greffées selon la méthode adaptée développée au cours de cette étude montrent que la mortalité à la fin du stade larvaire est de 11% lorsque les larves sont greffées dans les cupules en plastique et de 16% lorsqu'elles sont greffées dans des cupules en cire. Après 14 jours de développement, la mortalité atteint respectivement 25 et 30% (Tableau 10C). Ces résultats montrent que la modification de la technique d'Aupinel et *al.* (2005) consistant à homogénéiser la répartition des individus à l'échelle de chaque dispositif d'élevage est compatible avec l'élevage d'un grand nombre de larves et adaptée à l'étude des effets du thymol sur un grand nombre de paramètres. Par conséquent, cette technique a été adoptée pour la suite de cette étude.

Tableau 10 : Mortalité des larves d'abeilles élevées *in vitro* (A) Pourcentage de larves mortes parmi 48 greffées dans des cupules en plastique ou en cire disposées dans un dispositif d'élevage. (B) Pourcentage de larves mortes au cours de l'élevage d'individus greffés dans 6 dispositifs d'élevage selon la méthode originelle. (C) Pourcentage de larves mortes au cours de l'élevage d'individus greffés dans 6 dispositifs d'élevage selon la méthode développée dans cette étude.

		Pourcentage de mortalité des larves d'abeilles en conditions contrôlées													
A	Jour d'intoxication	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Plastique	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	6
	Cire	0	4	4	8	8	8	8	8	8	8	8	13	13	13
B	Jour d'intoxication	1	2	3	4	5	6								
	Plastique	0	6	6	8	9	26								
	Cire	0	10	12	13	15	28								
C	Jour d'intoxication	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Plastique	1	2	4	8	9	11	11	13	17	20	22	22	23	25
	Cire	0	2	5	11	14	16	16	18	21	22	25	25	28	30

II. ÉTUDE DES EFFETS LÉTAUX DU THYMOL SUR LE DÉVELOPPEMENT DES LARVES D'ABEILLES

À la fin de l'été, la reine diminue sa ponte, ce qui augmente en proportion le taux d'infestation du couvain en *Varroa*. C'est à cette période que le traitement au thymol est appliqué afin de réduire le nombre de *Varroas* présents dans la ruche et de maintenir une charge parasitaire basse durant l'hiver. Les ouvrières produites à cette période, dites abeilles d'hiver, sont donc exposées au thymol qui va par ailleurs s'accumuler dans l'ensemble des produits de la ruche. Ces abeilles ne seront pas renouvelées durant toute la mauvaise saison et auront la charge d'assurer la survie de la colonie et son redémarrage au printemps suivant. Il est donc vital pour la colonie que le thymol ne présente pas d'effet délétère pour les abeilles avant cette longue période hivernale. L'objet du travail présenté ci-après a donc été, dans un premier temps, la détermination des concentrations en thymol ayant un effet sur la mortalité larvaire jusqu'au début du stade nymphe aux yeux blancs, suite à une exposition par l'alimentation ou par la cire. Dans un deuxième temps, les paramètres de toxicité aiguë et chronique du thymol ont été déterminés après 2 et 6 jours d'intoxication par le calcul de la concentration induisant 50% de mortalité des abeilles présentes initialement (CL50) et la dose en thymol présentant 50% de mortalité de la population initiale (DL50). Ces périodes représentent la fin de consommation du premier aliment (2 jours) et la fin du stade larvaire (6 jours) avec la consommation totale de la nourriture larvaire.

II.1. Toxicité aiguë et chronique du thymol sur les larves exposées *via* la cire

Des cupules en cire neutre ou contaminée par des concentrations croissantes en thymol, de 200 à 5000 mg/kg de cire, ont été moulées et utilisées pour élever *in vitro* des larves d'abeilles. A la fin du stade larvaire, la mortalité des larves élevées en condition témoin solvant dans le Caisson Non Contaminé CNCT était de 7%, inférieure au seuil de 15% fixé par Aupinel et *al.*, (2009) pour que les données soient considérées comme exploitables. L'analyse statistique de l'effet du thymol sur la survie larvaire montre que le thymol présent dans la cire induit en revanche une augmentation très hautement significative de la mortalité ($p\text{-value} < 0,001$). Cet effet est observé pour les concentrations en thymol allant de 200 à 5000 mg/kg de cire, qui induisent toutes une mortalité larvaire très significativement supérieure au témoin solvant élevé dans le Caisson Non Contaminé CNCT (Figure 33).

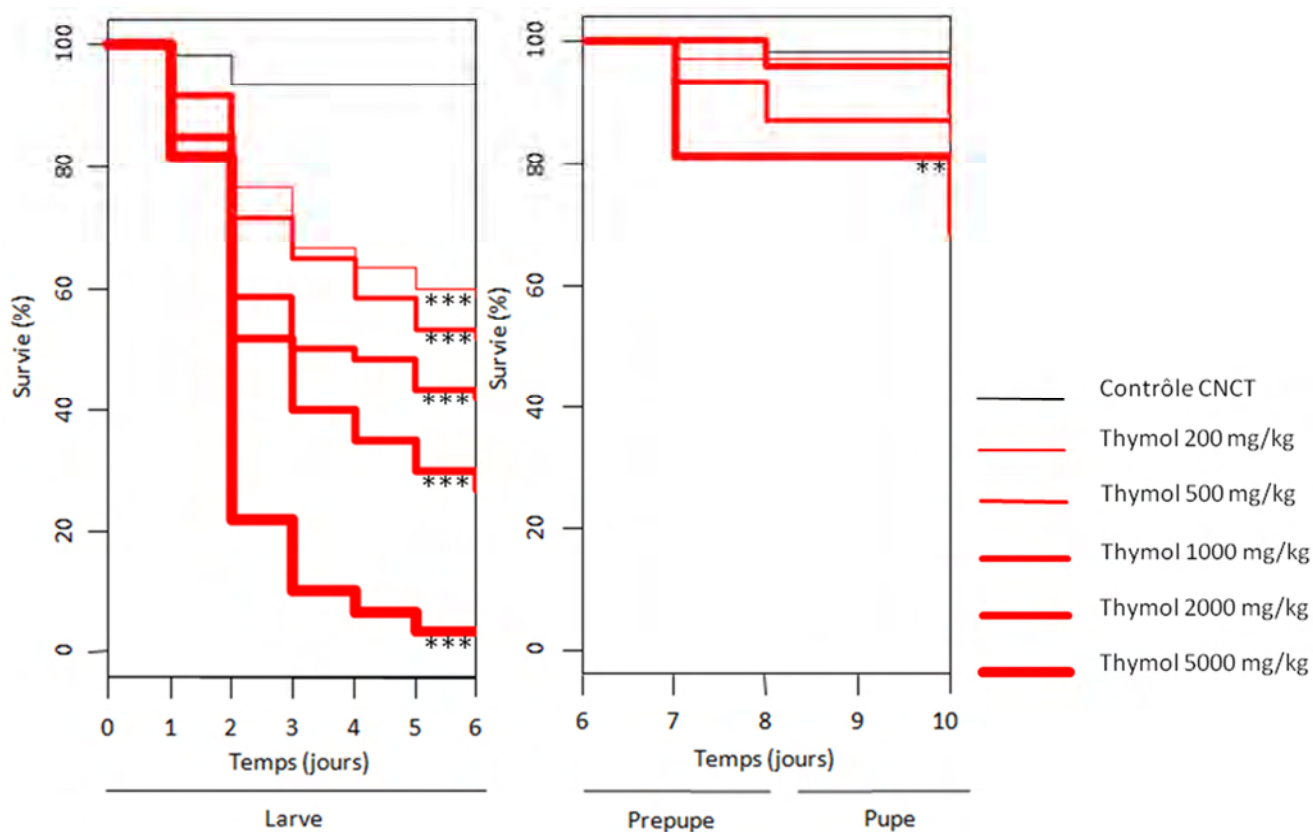


Figure 33 : Effet du thymol sur la survie des larves d'abeilles élevées *in vitro* dans des cupules en cire contaminée avec du thymol. ** P < 0,01 ; *** P < 0,001.

Pour les deux concentrations en thymol les plus élevées, respectivement 2000 et 5000 mg/kg de cire, une forte mortalité est observée durant les premiers stades larvaires avec respectivement 50 et 80% de mortalité 48 heures après le greffage. L'analyse statistique des effets du thymol sur la survie des individus, du stade prénympe jusqu'au stade nymphe aux yeux blancs, montre que le thymol présent dans la cire est également la seule variable explicative ayant un effet significatif sur le taux de survie de ces individus (p -value < 0,05). Toutefois, seule la concentration de 2000 mg de thymol par kg de cire induit une mortalité larvaire significativement différente du témoin (Figure 33).

II.2. Toxicité aiguë et chronique du thymol sur les larves exposées *via* la nourriture larvaire

Les larves ont été nourries avec l'aliment produit au laboratoire contaminé par des concentrations croissantes de thymol allant de 1 à 3000 mg/kg d'aliment. Dans cette partie de l'étude, l'élevage a été réalisé dans des cupules en plastique neutre afin de s'affranchir de toute présence éventuelle de résidus d'autres pesticides potentiellement présents dans la cire. A la fin du stade larvaire, la mortalité des individus du témoin solvant élevés dans le caisson non contaminé CNCT est de 15% ce qui, comme décrit précédemment, valide l'exploitabilité des résultats (Aupinel et *al.*, 2005). L'étude de la mortalité dans les différents témoins montre que l'acétone présente dans le témoin

solvant en caisson non contaminé CNCT n'induit pas d'augmentation de la mortalité larvaire, lorsque celle-ci est comparée au témoin eau élevé dans le caisson non contaminé (p-value = 0,79). De même, les vapeurs de thymol présentes dans les caissons CCT n'ont pas significativement augmenté la mortalité dans les témoins solvant élevés dans le caisson contaminé, en comparaison à la mortalité des témoins solvant élevés dans le caisson non contaminé CNCT (p-value = 0,53). La mortalité dans le groupe témoin exposé au diméthoate est de 39%, cette valeur ne varie pas de manière significative entre les répliquats (p-value = 0,15) ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Aupinel et *al.*, (2007). L'analyse statistique menée sur la mortalité des individus exposés au thymol montre que sa concentration dans l'aliment est la seule variable explicative ayant un effet significatif sur le taux de survie larvaire (p-value < 0,001). Cet effet est significatif de 100 à 3000 mg/kg d'aliment (Figure 34).

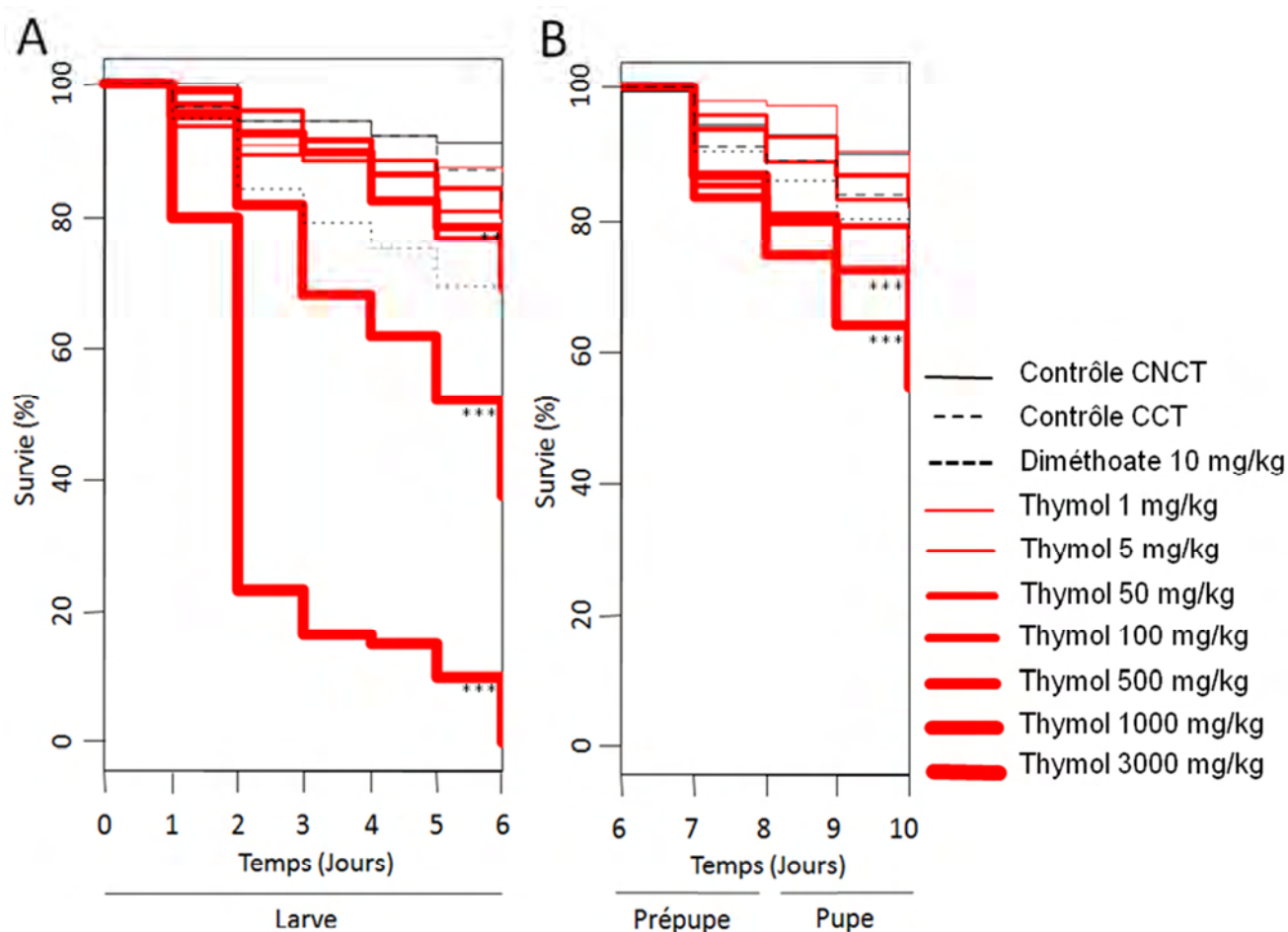


Figure 34 : Effet du thymol sur la survie des larves d'abeilles élevées *in vitro* dans des cupules en plastiques avec de la nourriture contaminée. ** P < 0,01 ; * P < 0,001.**

La concentration sans effet observé (NOEC) à la fin du stade larvaire, après 6 jours d'intoxication, est de 100 mg/kg d'aliment. Pour la concentration de 3000 mg de thymol par kg d'aliment, une forte mortalité a été observée durant les premiers stades larvaires avec 80% de larves

mortes au bout de 48 heures. Le thymol présent dans l'alimentation larvaire est également la seule variable explicative ayant un effet significatif sur le taux de survie des individus au stade prénymphé et nymphé aux yeux blancs (p -value < 0,001). Les concentrations de thymol allant de 500 à 1000 mg/kg d'aliment induisent également une mortalité significativement différente du témoin (Figure 34).

II.3. CL50 et DL 50 aiguë et chronique du thymol

La toxicité du thymol a en partie été évaluée par la détermination de la CL50 et de la DL50. La CL50 a pu être déterminée après 48 h d'exposition, c'est-à-dire à la fin de la consommation du premier aliment et après 6 jours d'exposition, c'est-à-dire à la fin du stade larvaire qui coïncide avec la consommation totale de la nourriture. La DL50 a été calculée, pour les larves exposées *via* la nourriture, à partir de la CL50 par le truchement de la quantité de nourriture absorbée par les larves.

Les CL50 sont pratiquement identiques dans les deux matrices (Tableau 11). La CL50 obtenue au cours d'une intoxication chronique de 6 jours *via* l'alimentation ou la cire est environ 3 fois moins élevée que celle obtenue au cours d'une intoxication aiguë de 48 heures.

Tableau 11 : Concentration en thymol induisant 50 % de mortalité larvaire (CL50) et la dose en thymol induisant 50% de mortalité larvaire (DL50) à la fin de la consommation du premier aliment et à la fin du nourrissage Les concentrations en thymol sont exprimées en milligrammes par kilogramme d'aliment ou de cire respectivement. Les doses sont exprimées en µg de thymol.

	CL50 (intervalle de confiance 95%) en mg/kg		DL50 en mg/larve
	Nourriture larvaire	Cire	Nourriture larvaire
48 h d'exposition (consommation du premier aliment)	2000 (1740 - 2310)	2150 (1500 - 3090)	0,044 (0,038 – 0,051)
6 jours d'exposition (fin de nourrissage)	700 (600 - 829)	690 (495 - 960)	0,123 (0,106 – 0,146)

III. ANALYSE DES EFFETS SUBLETAUX DU THYMOL SUR LE DEVELOPPEMENT DES LARVES D'ABEILLES

Bien que plus subtils que les effets létaux, les effets sublétaux d'un composé sont néanmoins de nature délétère et se traduisent par un affaiblissement de la population intoxiquée et une vulnérabilisation vis-à-vis des pathogènes ou des changements environnementaux (Suchail et *al.*, 2001 ; Vidau et *al.*, 2011 ; Boncristiani et *al.*, 2012). Ces effets sont plus difficiles à déterminer et à expliquer, mais sont également les plus couramment retrouvés dans la nature. Cette étude a donc été complétée par la recherche des effets sublétaux d'une alimentation contaminée au thymol sur différents paramètres développementaux que sont la croissance pondérale, l'expression de marqueurs de transcription génique et l'activité enzymatique.

III.1. Effet du thymol sur la croissance pondérale des larves

La croissance pondérale des larves est un indicateur simple à mesurer et particulièrement informatif sur la capacité de ces larves à accomplir un développement nymphal complet. Dans un premier temps, la croissance pondérale normale a été déterminée à partir des pesées effectuées sur les individus prélevés dans le groupe témoin solvant élevé dans le Caisson Non Contaminé CNCT afin de déterminer la moyenne et l'écart type du poids des larves à chaque stade de développement. Dans un deuxième temps, la croissance pondérale normale a été comparée à la croissance des larves exposées à différentes concentrations en thymol. Les résultats montrent qu'après 1 jour de développement dans des conditions normales d'élevages, les larves pèsent en moyenne 1,2 mg alors qu'à la fin du stade larvaire (6 jours), celles-ci ont multiplié leurs poids environ par 110 et pèsent en moyenne 144 mg. Durant le développement larvaire, la croissance pondérale des individus est ainsi très significative entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour (p-value < 0,001) et entre le 3^{ème} et le 6^{ème} jour (p-value < 0,001) (Figure 35).

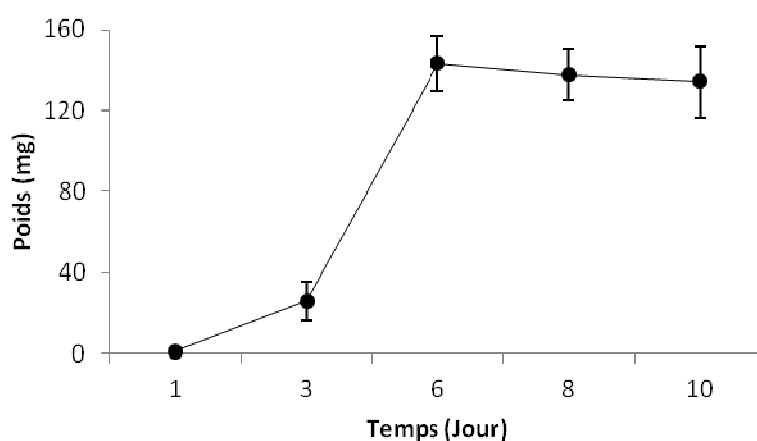


Figure 35 : Évolution du poids des larves témoins manipulation élevées dans des conditions contrôlées jusqu'au dixième jour de développement.

La variation de poids entre la fin du stade larvaire (6 jours) et le stade prénympe (8 jours) n'est en revanche pas significative, mais elle le devient à nouveau (p-value < 0,01) entre le stade prénympe et le stade nymphe aux yeux blancs (10 jours).

Lorsque le poids des individus témoins solvant élevés dans le caisson CNCT est comparé à celui des individus témoins eau élevés dans ce même caisson, aucune différence significative n'est observée (p-value = 0,16). De même, les vapeurs de thymol émanant de la nourriture larvaire distribuée aux individus exposés n'affectent pas la croissance pondérale des individus du témoin solvant se trouvant dans les mêmes dispositifs d'élevage (p-value = 0,26). Le diméthoate présent dans la nourriture larvaire des individus du témoin de mortalité n'induit aucune variation significative du poids (p-value = 0,16) comme décrit par Aupinel et *al.* (2009). En revanche, une diminution

significative du poids et une augmentation de la variance sont observées à la fin du stade larvaire pour les individus exposés à 500 et 1000 mg de thymol/kg de nourriture (Figure 36).

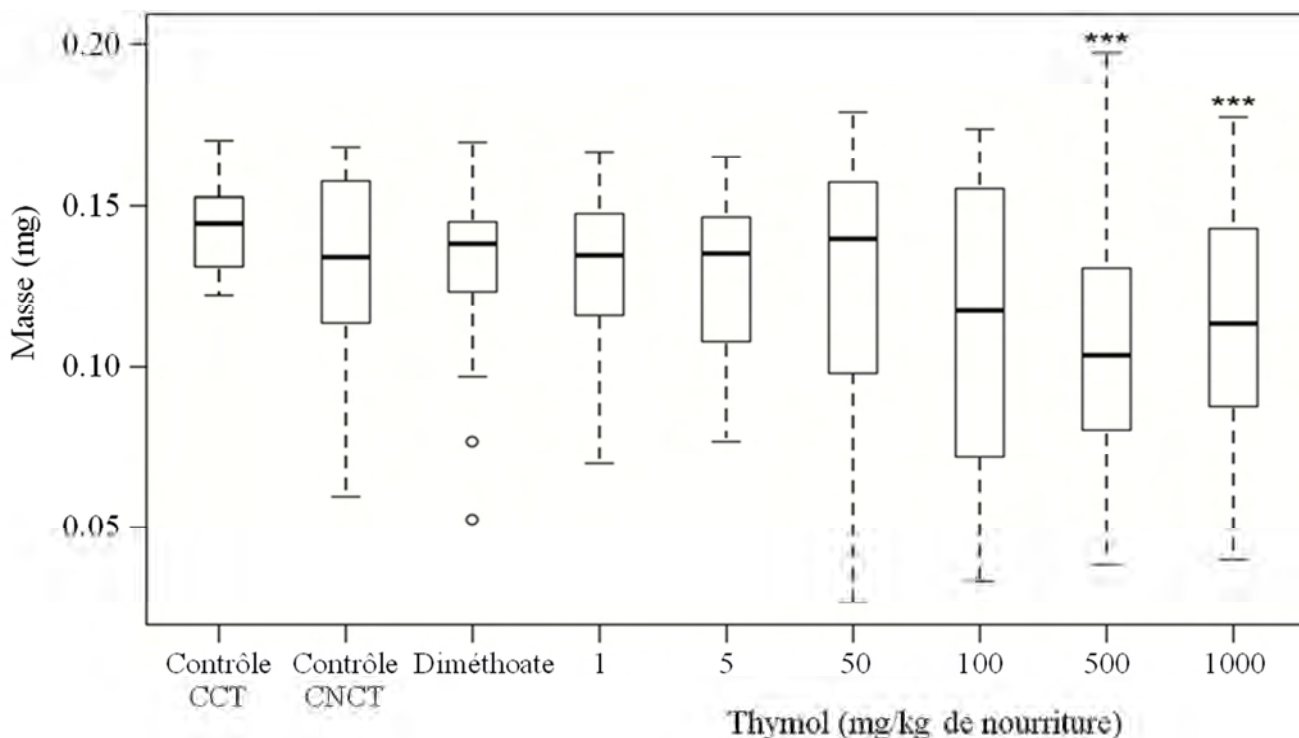


Figure 36 : Poids des larves d'abeilles à la fin du stade larvaire lorsque celles-ci ont été élevées *in vitro* dans différentes conditions. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

III.2. Effet du thymol sur l'expression des gènes

Le gène de ménage employé dans cette étude pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt devait être exprimé de façon constante tout au long du développement larvaire et ne pas varier lorsque l'individu est exposé au thymol. Les gènes candidats, l'actine et RP 49, ont été choisis parmi ceux décrits dans la littérature comme exprimés de façon constante dans ces deux conditions (Lourenço et *al.*, 2008 ; Evans, 2004 ; Boncristiani et *al.*, 2012). L'analyse non normalisée du nombre de copies de chaque gène candidat montre en effet que le taux de transcription de ces deux gènes varie peu et de façon non significative tout au long du développement larvaire et quelle que soit la concentration en thymol dans la nourriture larvaire (Figure 37 et Figure 38). L'expression du gène RP 49 a été employée dans la suite de cette étude pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt en accord avec Lourenço et *al.* (2008) qui l'ont employé au cours d'une étude sur l'effet de l'hormone juvénile III sur le développement larvaire.

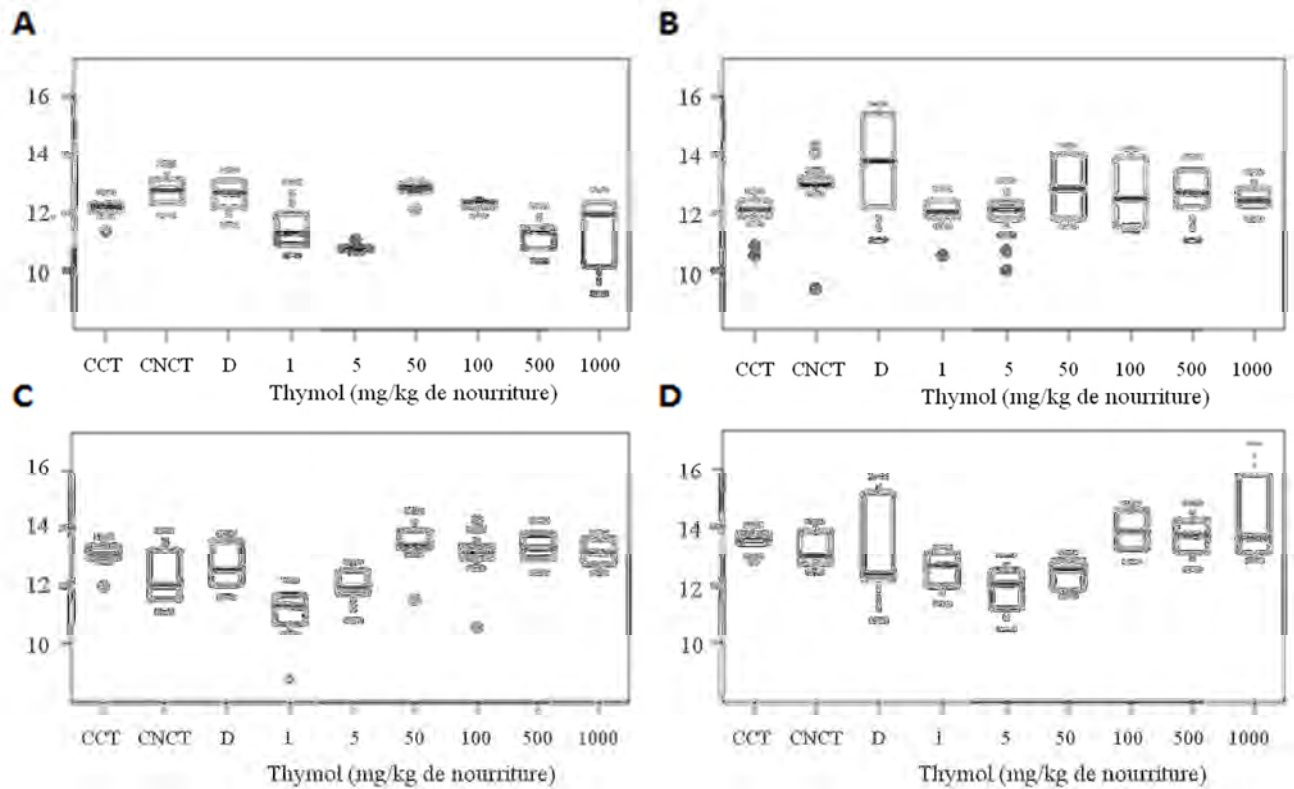


Figure 37 : Effet du thymol sur le nombre de transcrits de l'actine en log base 2 au cours du développement larvaire (A) Un jour; (B) 6 jours; (C) 8 jours (D) et 10 jours après greffage.

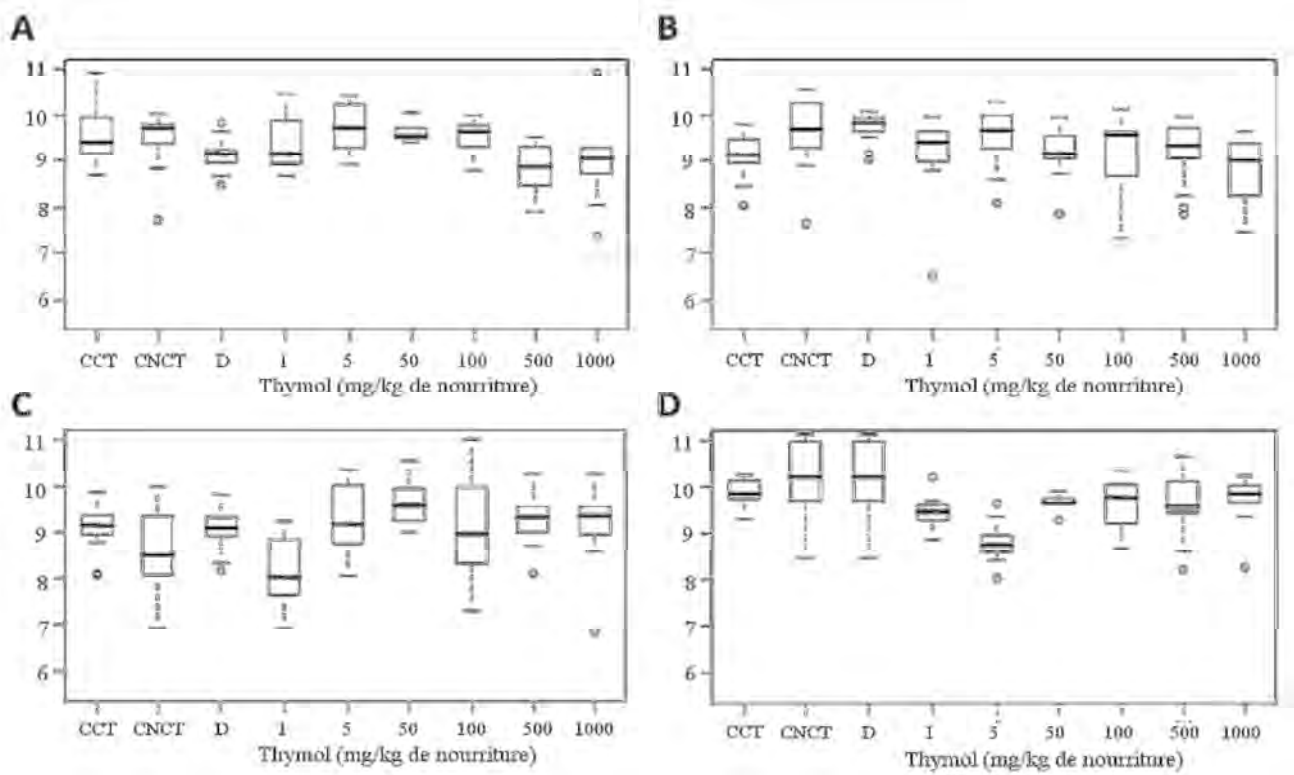


Figure 38 : Effet du thymol sur le nombre de transcrits de la protéine ribosomiale 49 en log base 2 au cours du développement larvaire. (A) un jour ; (B) 6 jours ; (C) 8 jours ; (D) 10 jours après greffage.

III.3. Effet du thymol sur l'expression des gènes marqueurs de l'immunité et sur l'expression de la vitellogénine, marqueur du développement.

Dans cette étude, les effets sublétaux du thymol sur le développement larvaire ont été étudiés *via* l'expression de gènes marqueurs de l'immunité et du développement de l'abeille. Les marqueurs de l'immunité ont été choisis parmi les gènes de l'immunité humorale (peptide antimicrobien), cellulaire (phagocytose) et sociale. Il s'agit des gènes de l'abaecine, du lysozyme, de la protéase à sérine 14, de la serpine 5 et de la phénol oxydase. Le marqueur du développement qui a été choisi, est le gène de la vitellogénine, une protéine pléiotropique impliquée dans la croissance, la fécondité et le temps de vie des abeilles. Les variations de taux de transcription des gènes étudiés ont été mesurées en fonction du temps et des traitements appliqués, puis un modèle linéaire a été ajusté afin de déterminer l'effet du thymol sur l'expression génique. Pour les données relatives à l'expression de l'abaecine, du Lysozyme et de la phénol oxydase, la linéarisation n'a cependant pas été possible quelles que soient les méthodes de transformation des données appliquées. L'analyse a alors été réalisée stade par stade à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis et les résultats ont été interprétés avec précaution.

Les résultats montrent que ni la présence de vapeurs de thymol dans le caisson (témoin CCT), ni le solvant, ni le diméthoate n'induisent de variation significative du niveau de l'expression des gènes ciblés.

III.3.1 Expressions géniques non linéarisables

L'analyse statistique des données obtenues concernant l'effet du thymol sur l'expression de l'abaecine, du lysozyme et de la phénol oxydase, dépeint un système complexe faisant intervenir des relations non linéaires. Ce type de relation est très difficile à interpréter et peut autant résulter d'une variation d'un paramètre non mesuré que d'une caractéristique propre du composé testé. C'est pourquoi l'exploitation de l'ensemble des résultats concernant l'expression de ces trois gènes en fonction des différentes concentrations en thymol présentes dans la nourriture larvaire se limitera à une étude descriptive des différences observées entre les individus pris au même stade.

I.1.1.1 Effet du thymol sur l'expression de l'abaecine

La cinétique d'expression de l'abaecine établie chez les individus non exposés au thymol montre que l'expression est inférieure à la limite théorique de quantification un jour après le greffage (Figure 39). Elle augmente ensuite très significativement ($p\text{-value} < 0,001$) pour atteindre son maximum à la fin du stade larvaire (6 jours). Elle diminue ensuite progressivement de telle façon qu'aucune variation significative n'est observée entre la fin du stade larvaire et le stade prénympe (8^{ème} jour) ($p\text{-value} = 0,17$) ou entre le stade prénympe et le stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème}

jour) (p -value = 0,08). Cette diminution est cependant significative lorsque le niveau d'expression de l'abaecine à la fin du stade larvaire est comparé à celui des nymphes aux yeux blancs (p -value < 0,01).

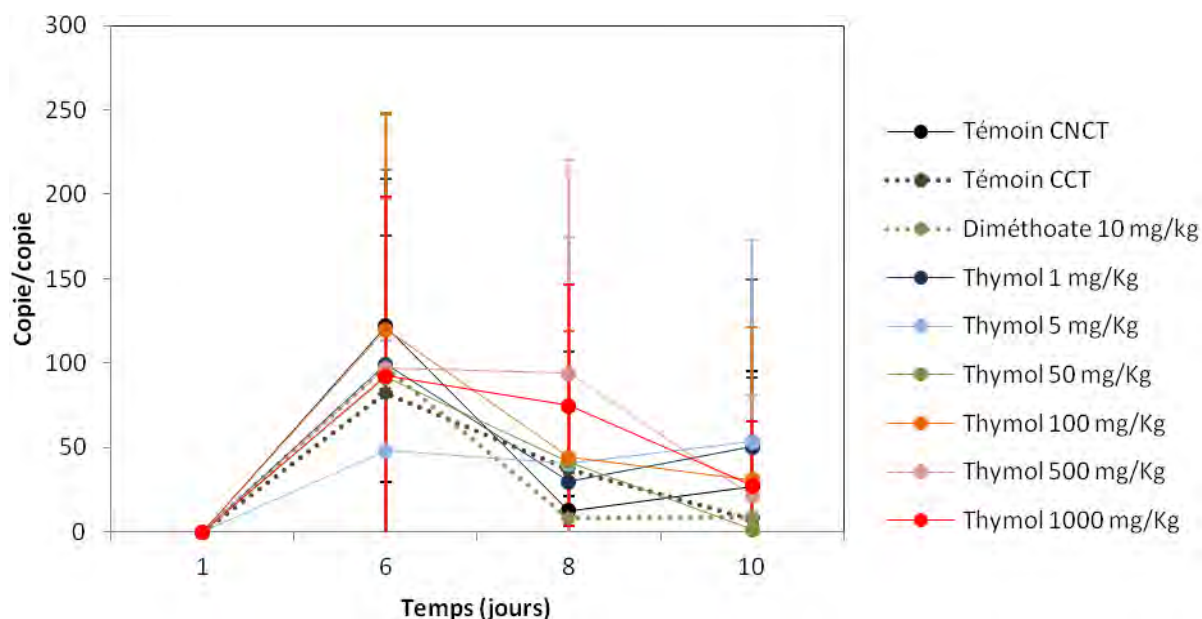


Figure 39 : Expression normalisée de l'abaecine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

L'analyse comparative des niveaux d'expression de l'abaecine chez les individus témoins et ceux exposés au thymol montre que le thymol, présent dans la nourriture à une concentration de 1000 mg/kg, induit au stade prénymphe une augmentation significative du taux de transcription de l'abaecine (p -value < 0,05). (Figure 40).

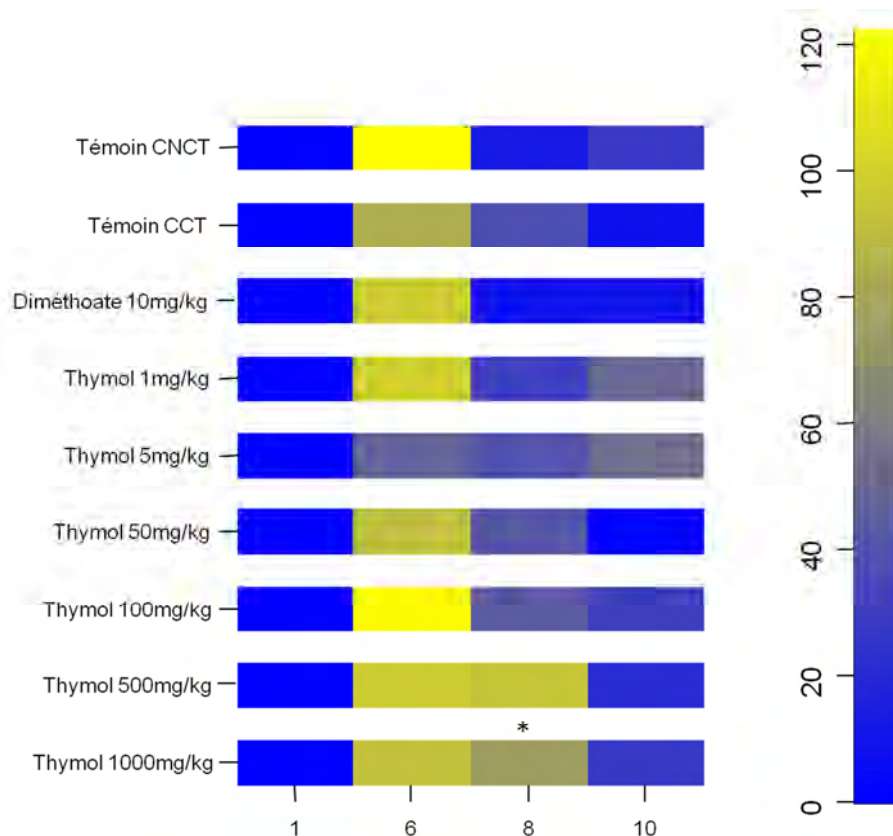


Figure 40 : Diagramme de l'expression normalisée de l'abaecine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (*) $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).**

1.1.1.2 Effet du thymol sur l'expression du lysozyme

L'expression du lysozyme ne varie pas significativement entre le premier jour après le greffage et la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) (p -value = 0,065), de même qu'entre la fin du stade larvaire et celui de prénymph (p-value = 0,09). En revanche, l'expression du lysozyme diminue significativement (de moitié) entre le début du stade larvaire et le stade de prénymph (8^{ème} jour) (p -value > 0,001) et reste stable jusqu'au stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p -value = 0,72) (Figure 41).

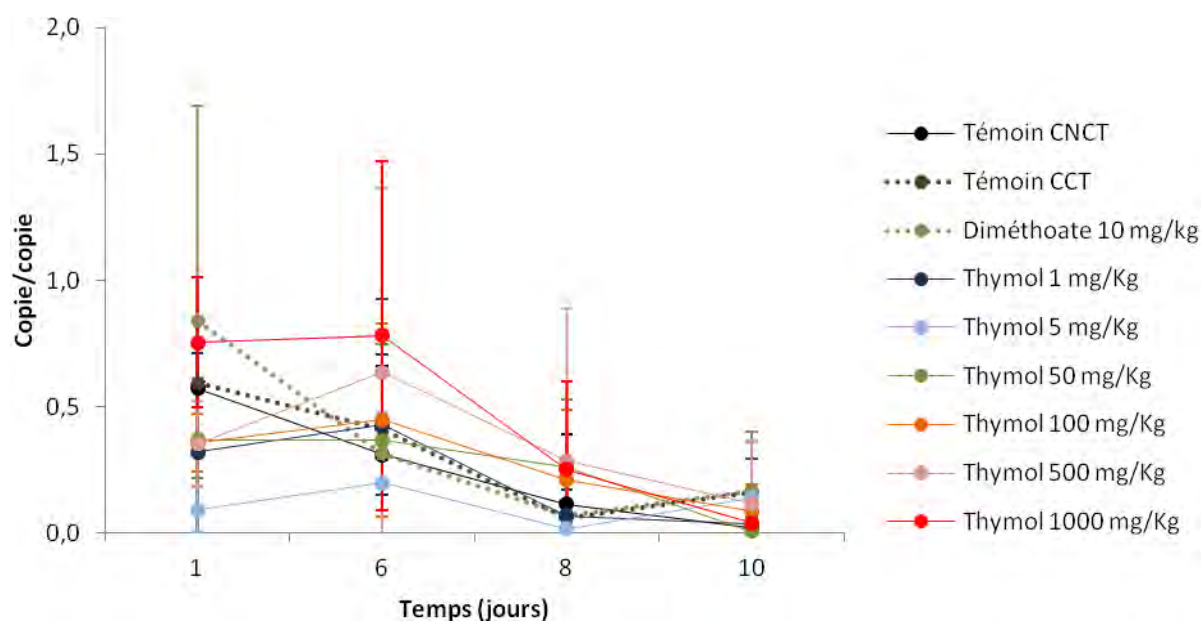


Figure 41 : Expression normalisée du lysozyme au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

L'expression du lysozyme à la fin du stade larvaire chez les individus soumis à une concentration en thymol de 1000 mg/kg de nourriture est significativement plus élevée que dans le témoin CCT (p -value < 0,05). De même, au stade prénympe cette expression est plus importante chez les individus exposés à 100 mg de thymol/kg de nourriture que dans le témoin (p -value < 0,05). Au contraire, au stade nymphe aux yeux blancs, le taux de transcription du lysozyme est plus faible chez les individus soumis à une concentration de 1000 mg de thymol/kg de nourriture (p -value < 0,05) toujours comparativement au témoin (Figure 42).

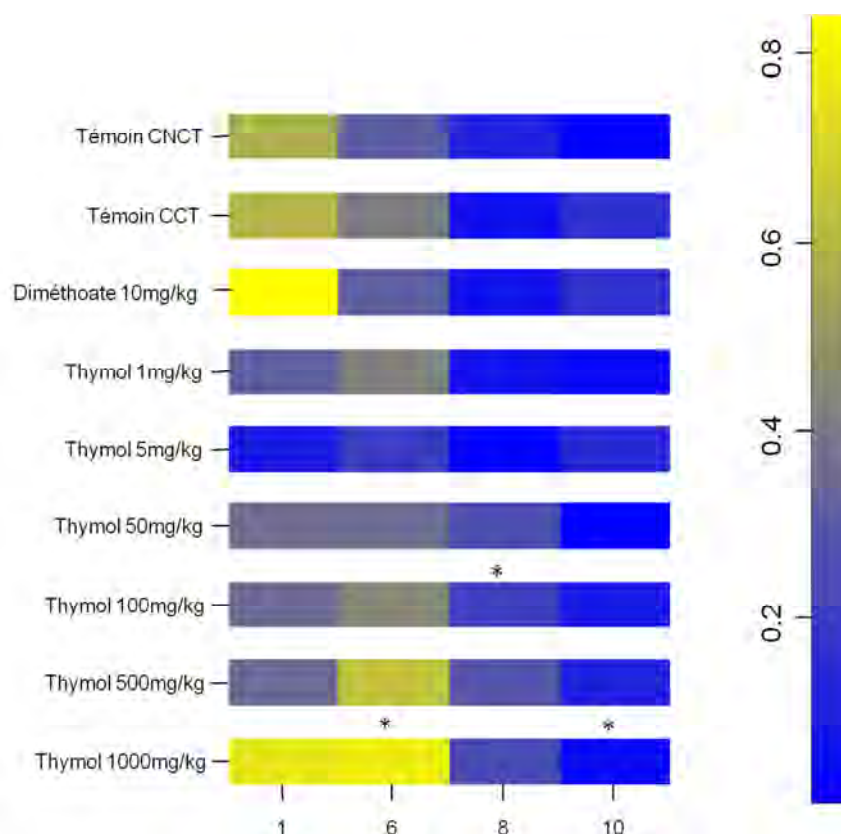


Figure 42 : Diagramme de l'expression normalisée du lysozyme au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (*) $P < 0,001$; * $P < 0,05$).**

1.1.1.3 Effet du thymol sur l'expression de la prophénol oxydase

La cinétique d'expression de la prophénol oxydase au cours du développement larvaire, établie chez les des individus non exposés au thymol, montre que cette expression est constante du 1^{er} jour après le greffage jusqu'à la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) (p -value = 0,52). Elle diminue ensuite de moitié entre la fin du stade larvaire et le stade prénymphe (8^{ème} jour) (p -value < 0,05) et une légère augmentation est observée au stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p -value = 0,05) (Figure 43).

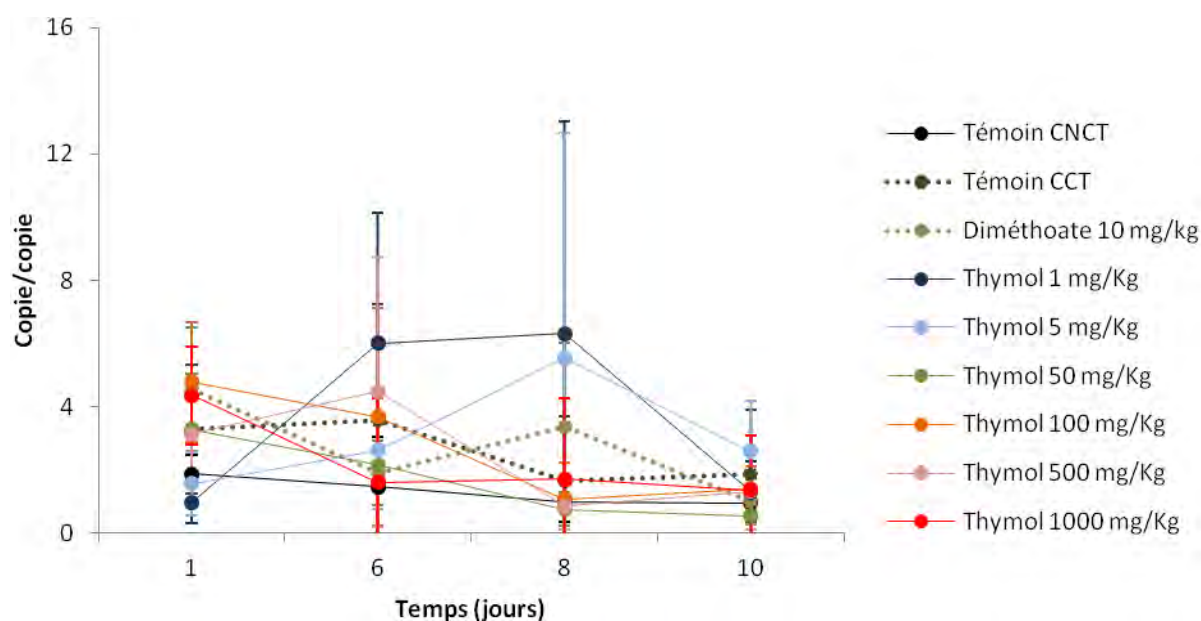


Figure 43 : Expression normalisée de la prophénol oxydase au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

A la fin du stade larvaire et au stade nymphe aux yeux blancs, l'expression de la prophénol oxydase chez les individus exposés à 1000 mg de thymol/kg d'aliment est significativement plus faible que chez les individus témoins CCT (p-value < 0,05). Mais ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de précaution car à ce stade, le niveau d'expression de la prophénol oxydase se situe en dessous du seuil théorique de quantification (Figure 44).

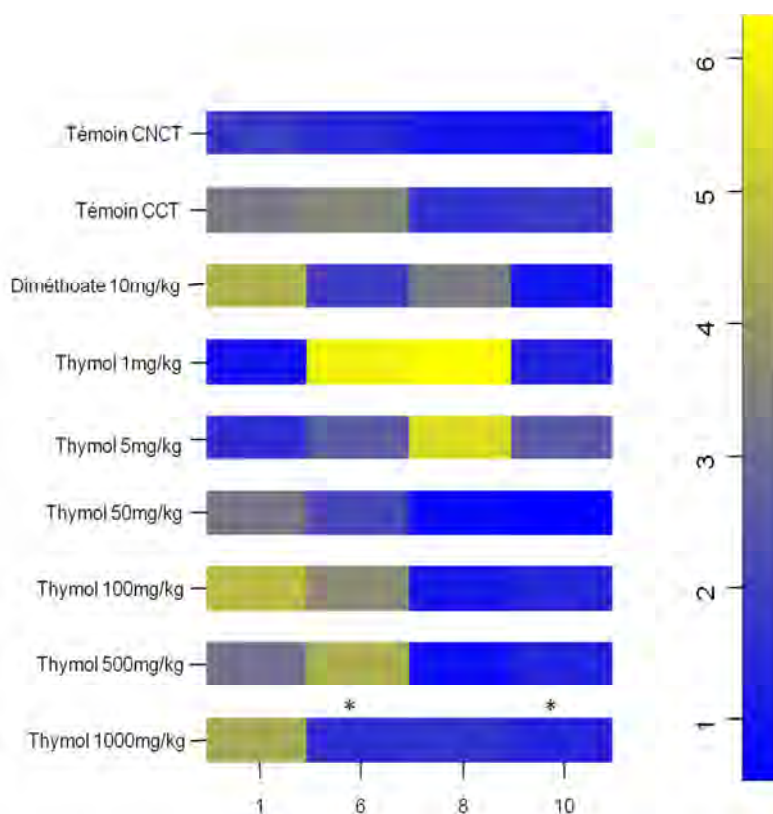


Figure 44 : Diagramme de l'expression normalisée de la prothénol oxydase au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (*) $P < 0,001$; * $P < 0,05$).**

III.3.2 Expressions géniques linéarisables

Les données concernant l'expression de la protéase à sérine 14 (SP14), de la serpine 5 et de la vitellogénine ont pu faire l'objet d'un ajustement à un modèle linéarisé. L'effet du thymol sur l'expression de ces gènes a pu être étudié à l'aide de tests paramétriques sur l'ensemble du jeu de données.

1.1.1.4 Effet du thymol sur l'expression de la protéase à sérine 14

La cinétique d'expression de SP14 au cours du développement larvaire établie chez les individus non exposés au thymol montre que cette expression ne varie pas de manière significative (p -value = 0,18) (Figure 45). De même, l'analyse statistique montre que le thymol n'a pas d'effet sur l'expression de SP14 quel que soit le stade de développement (p -value = 0,63) (Figure 46).

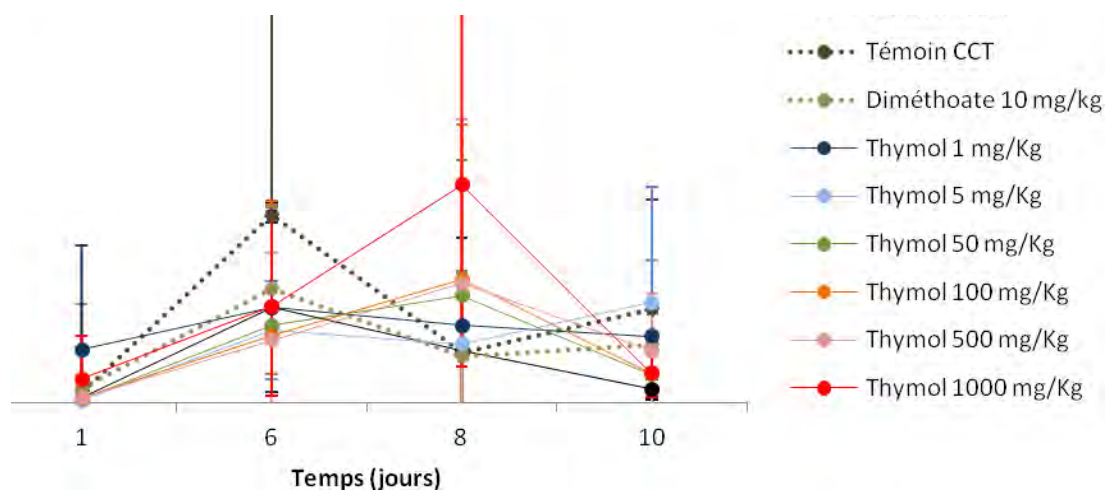


Figure 45 : Expression normalisée de la protéase à sérine 14 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

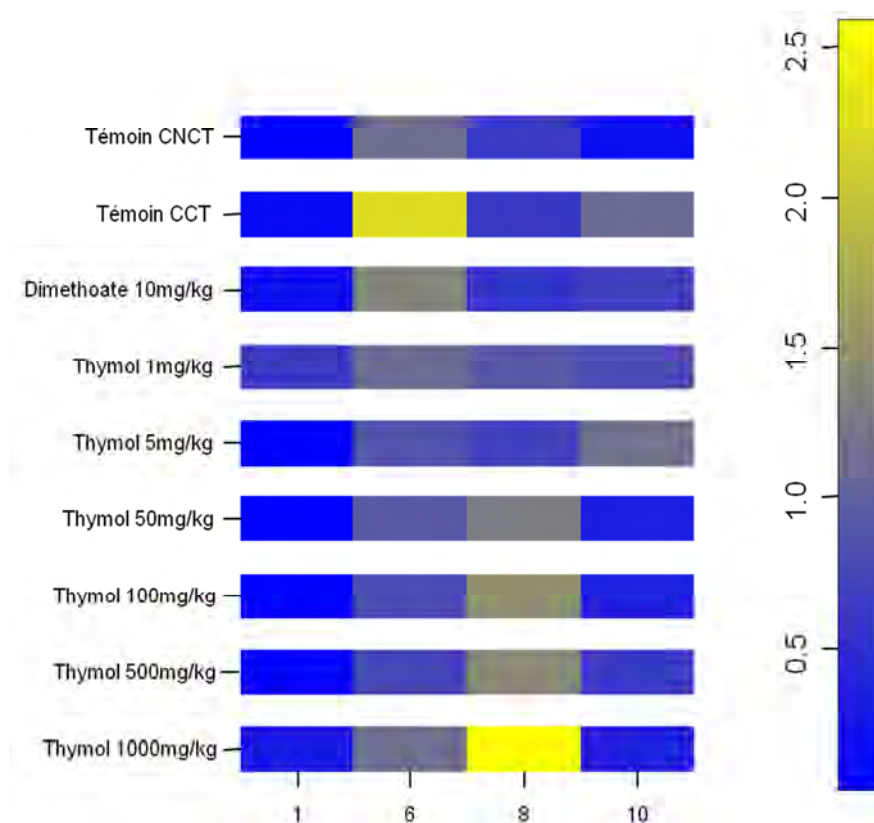


Figure 46 : Diagramme de l'expression normalisée de la protéase à sérine 14 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

1.1.1.5 Effets du thymol sur l'expression de la serpène 5

La cinétique de l'expression de la serpine 5 au cours du développement larvaire chez les individus non exposés au thymol montre que, comme pour SP14, cette expression ne varie pas de manière significative (p -value = 0,21) (figure 47). De même, l'analyse statistique montre que le thymol n'a pas d'effet sur l'expression de la serpine 5 quel que soit le stade de développement (p -value = 0,51) (Figure 48).

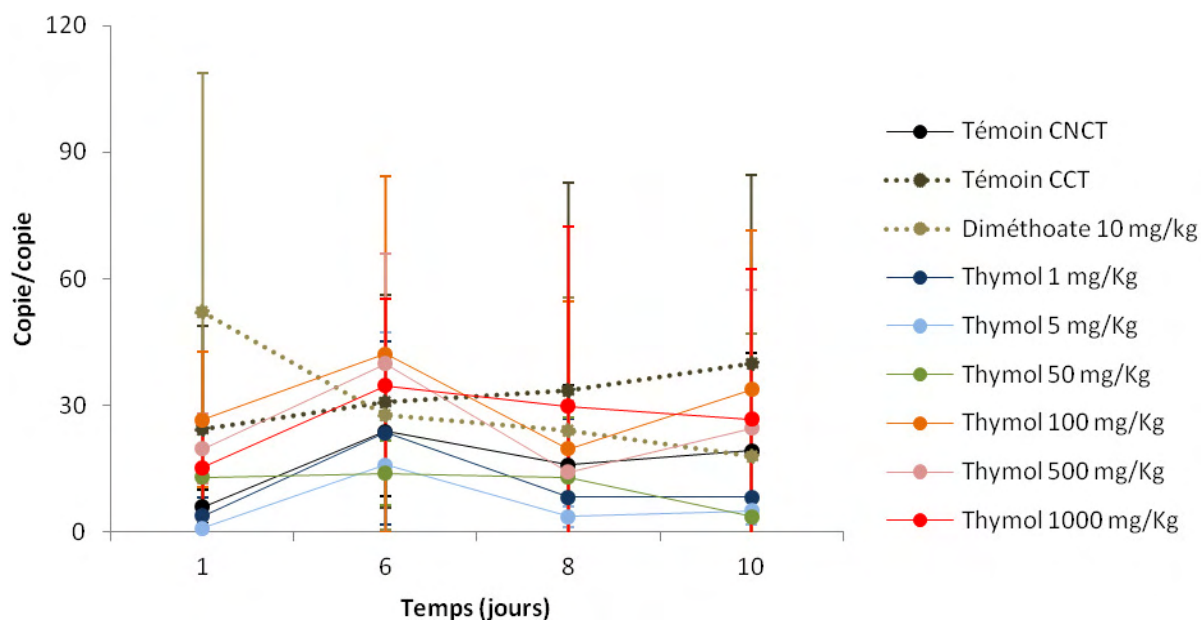


Figure 47 : Expression normalisée de la serpine 5 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

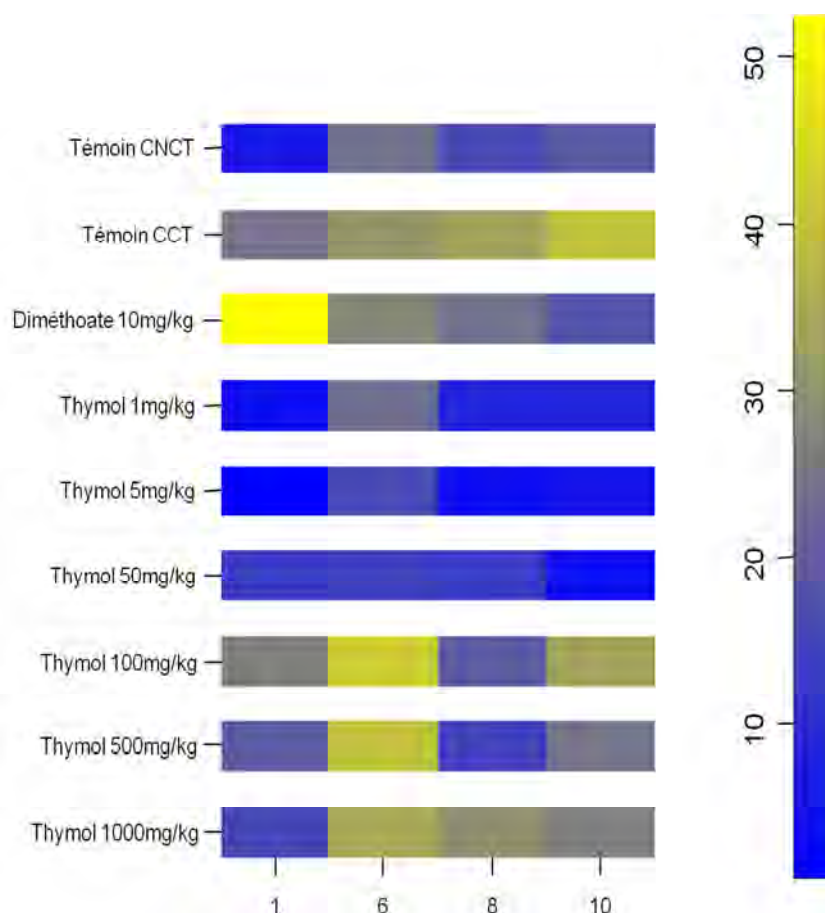


Figure 48 : Diagramme de l'expression normalisée de la serpine 5 au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (*) $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).**

1.1.1.6 Effet du thymol sur l'expression de la vitellogénine

La cinétique d'expression de la vitellogénine établie chez les individus non intoxiqués montre que cette expression augmente significativement à partir du 1^{er} jour après le greffage pour atteindre son maximum à la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) (p -value $< 0,05$). Son expression diminue ensuite pour atteindre un niveau significativement plus faible au stade prénymphe (8^{ème} jour) (p -value $< 0,001$). Ce niveau est le plus bas enregistré au cours du développement, significativement plus faible qu'au 1^{er} jour (p -value $< 0,05$). Cette expression reste constante entre le stade prénymphe et le stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p -value = 0,052) (Figure 49).

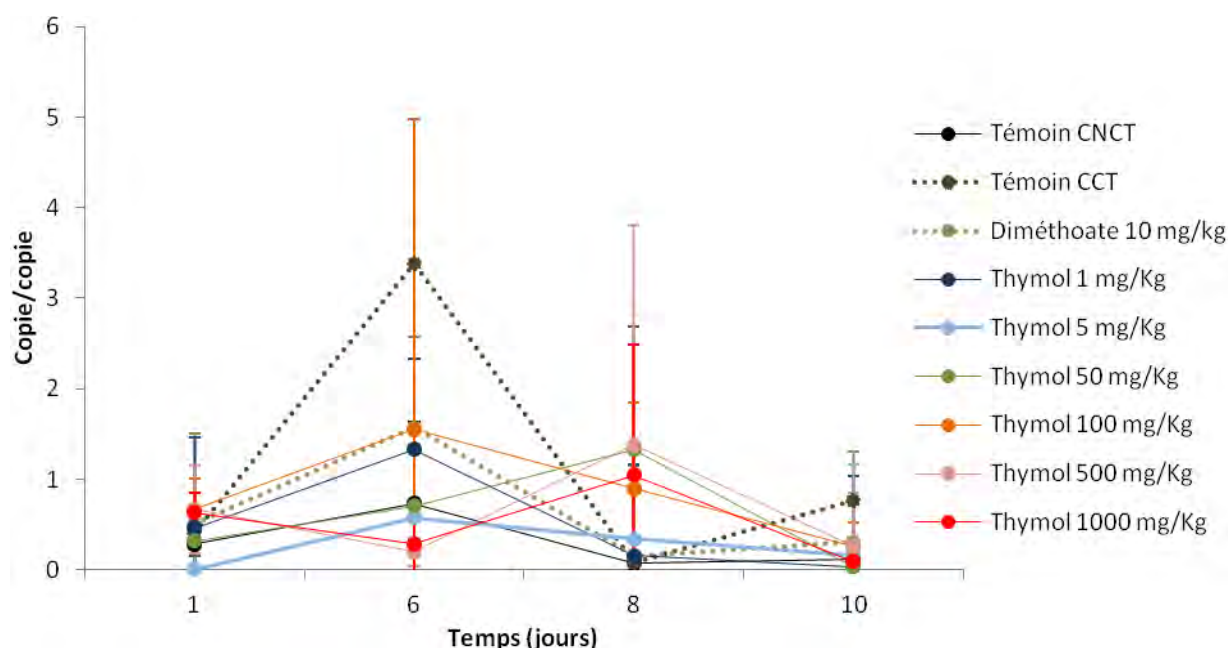


Figure 49 : Expression normalisée de la vitellogénine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire.

L'analyse statistique montre que le thymol a un effet très significatif ($p\text{-value} < 0,001$) sur l'expression de la vitellogénine durant le développement. Alors que le pic d'expression de la vitellogénine est observé à la fin du stade larvaire chez les individus non exposés au thymol, ce maximum n'est atteint que 48 heures plus tard chez les individus exposés à 50, 500 ou 1000 mg de thymol/kg d'aliment. Ce décalage se traduit par des niveaux d'expression différents chez les individus témoins CCT et chez les individus exposés au thymol à ces deux stades de développement. Ainsi, l'expression de la vitellogénine est significativement plus faible à la fin du stade larvaire chez les individus exposés à 500 ou 1000 mg de thymol/kg de nourriture ($p\text{-value} < 0,01$ et $p\text{-value} < 0,01$ respectivement) et significativement plus forte au stade prénympe chez les individus exposés à 50, 100, 500 ou 1000 mg de thymol/kg de nourriture ($p\text{-value} < 0,05$, $p\text{-value} < 0,01$, $p\text{-value} < 0,05$, $p\text{-value} < 0,01$ respectivement) (Figure 50). Aux autres stades, en revanche, aucun effet significatif du thymol n'est observé sur l'expression de la vitellogénine.

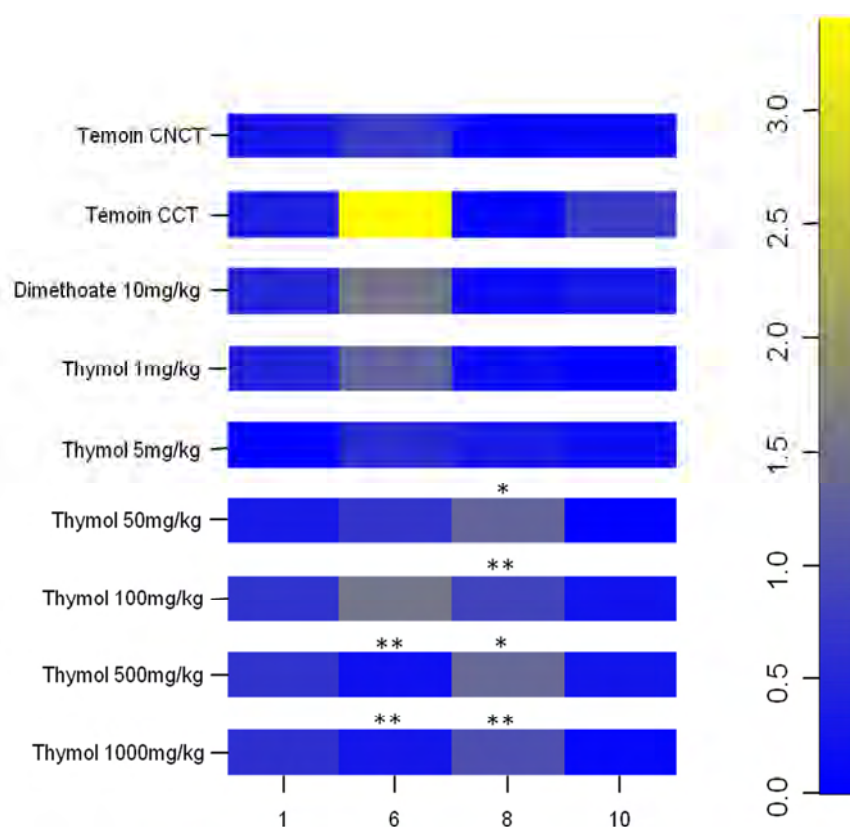


Figure 50 : Diagramme de l'expression normalisée de la vitellogénine au cours du développement en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture larvaire. Les niveaux d'expression significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (***) $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$).

III.4. Effet du thymol sur l'activité enzymatique

Dans cette étude, les effets sublétaux du thymol sur le développement larvaire ont été étudiés *via* l'activité d'enzymes marqueurs de l'immunité cellulaire, du développement larvaire et du système de détoxification. L'activité de quatre marqueurs a été étudiée : l'activité du lysozyme, un marqueur de l'immunité cellulaire impliquée dans la destruction du phagosome, les activités de la glucose déshydrogénase et de la phénol oxydase, marqueurs de la réponse cellulaire, *via* leur activité oxydative, et du développement larvaire *via* la mélanisation de la cuticule et enfin l'activité de la Glutathion S transférase (GST) impliquée dans la phase II du processus de détoxification. Les variations d'activité enzymatique des marqueurs étudiés ont été mesurées en fonction du temps et des traitements appliqués, puis un modèle linéaire a été ajusté afin de tenter de déterminer l'effet du thymol sur l'activité de ces marqueurs. Malheureusement, les activités des divers marqueurs utilisés se sont révélées non linéarisables. L'effet du thymol sur l'activité des enzymes marqueurs a donc été déterminé à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis stade par stade.

Les résultats montrent que ni la présence de vapeurs de thymol dans le caisson (témoin CCT), ni le solvant, ni le diméthoate n'induisent de variation significative de l'activité des marqueurs ciblés.

I.1.1.7 Effet du thymol sur l'activité de la phénol oxydase

La cinétique de l'activité enzymatique de la phénol oxydase établie chez les individus non exposés au thymol montre que l'activité de cette enzyme augmente significativement (double) entre la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) et le stade de prénymph (8^{ème} jour) (p -value < 0,05) avant de se stabiliser entre le stade prénymph et le stade nymph aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p -value = 0,07) (Figure 51).

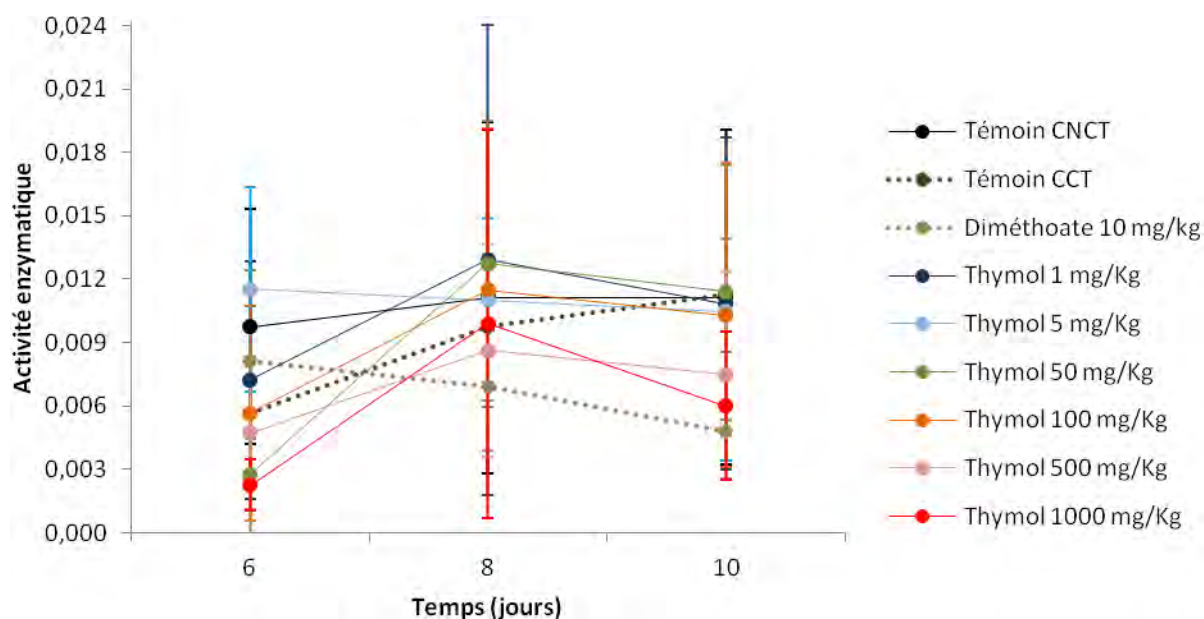


Figure 51 : Activité de la phénol oxydase exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture.

Le thymol présent dans la nourriture larvaire n'a pas d'effet significatif sur l'activité enzymatique de la phénol oxydase quel que soit le stade étudié ou la concentration en thymol employée (Figure 52).

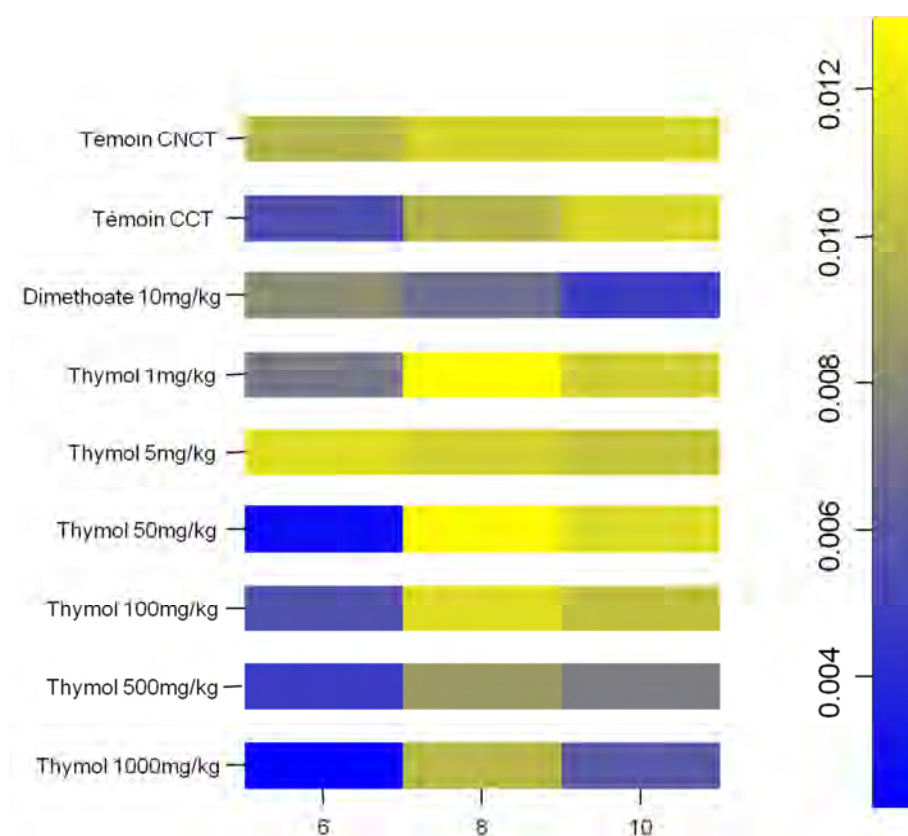


Figure 52 : Diagramme du niveau d'activité relative de la phénol oxydase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture.

III.5. Effet du thymol sur l'activité du lysozyme

La cinétique de l'activité du lysozyme établie chez les individus non intoxiqués montre que cette activité reste constante de la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) jusqu'au stade prénymph (p-value = 0,87) (8^{ème} jour) et augmente significativement entre le stade prénymph et le stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p-value < 0,05) (Figure 53).

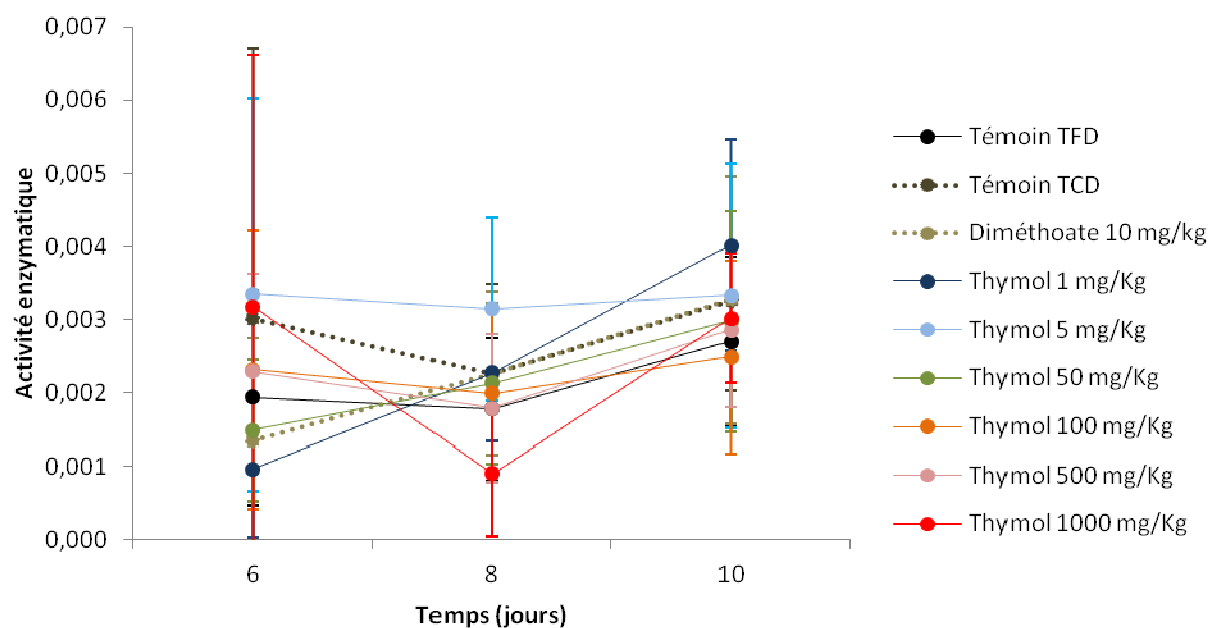


Figure 53 : Activité du lysozyme exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture.

Le thymol présent dans la nourriture larvaire n'a pas d'effet significatif sur l'activité enzymatique du lysozyme quel que soit le stade étudié ou la concentration en thymol employée (Figure 54).

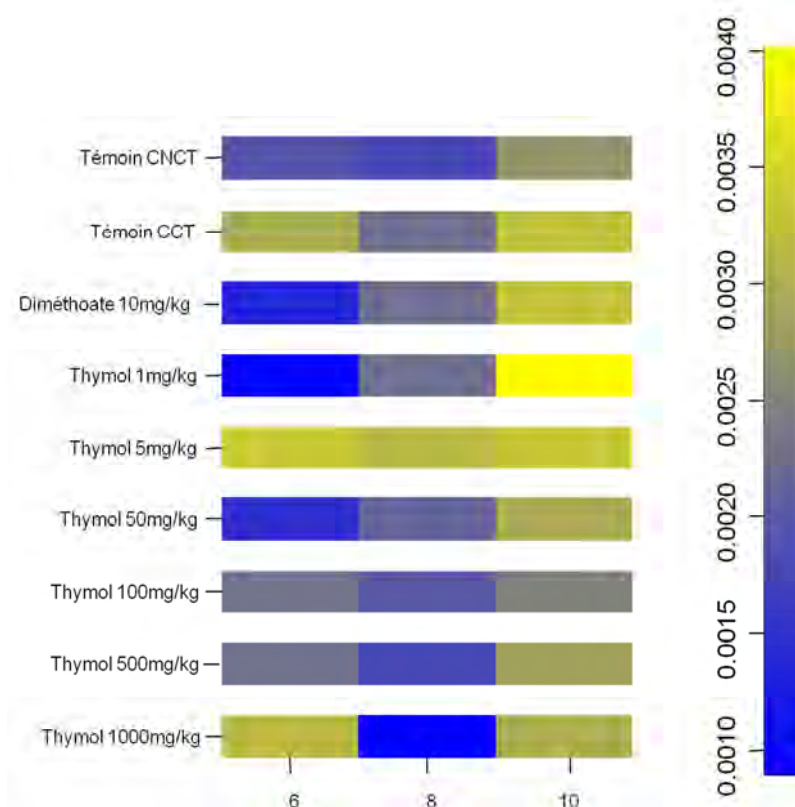


Figure 54 : Diagramme du niveau d'activité relative du lysozyme au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activités significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque. (P < 0,01).**

III.6. Effet du thymol sur l'activité de la glucose déshydrogénase

La cinétique de l'activité de la glucose déshydrogénase établie au cours du développement larvaire chez les individus non exposés au thymol montre que l'activité de cette enzyme diminue de manière significative entre la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) et le stade prénymphé (8^{ème} jour) (p-value < 0,01) puis reste constante entre le stade prénymphé et le stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p-value = 0,10) (Figure 55).

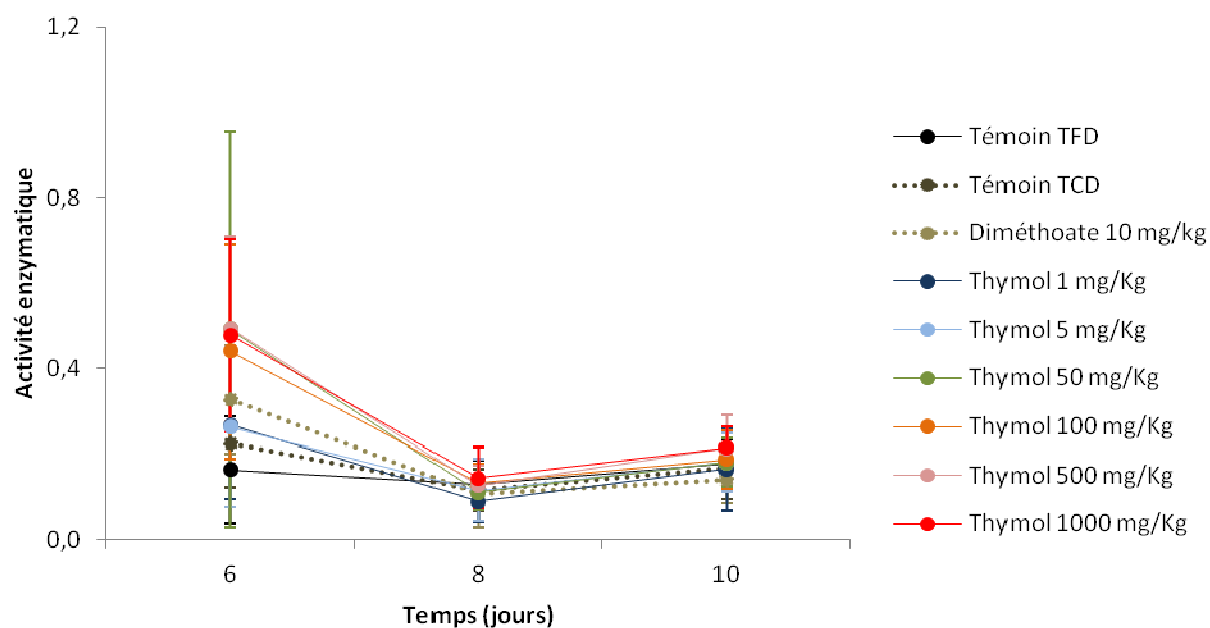


Figure 55 : Activité de la glucose deshydrogénase exprimée en unités relatives à la quantité totale de protéines totales au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture.

L'analyse statistique montre que le thymol a un effet significatif sur l'activité de la glucose déshydrogénase au cours du développement larvaire ($p\text{-value} < 0,01$). La détermination statistique des doses de thymol responsables de cet effet et du stade auquel il a lieu indique qu'au stade prénymphé, les concentrations en thymol allant de 100 à 1000 mg/kg de nourriture induisent toutes une augmentation significative de l'activité de la glucose déshydrogénase, comparativement au témoin CCT ($p\text{-value} < 0,01$; $p\text{-value} < 0,001$; $p\text{-value} < 0,01$, respectivement) (Figure 56).

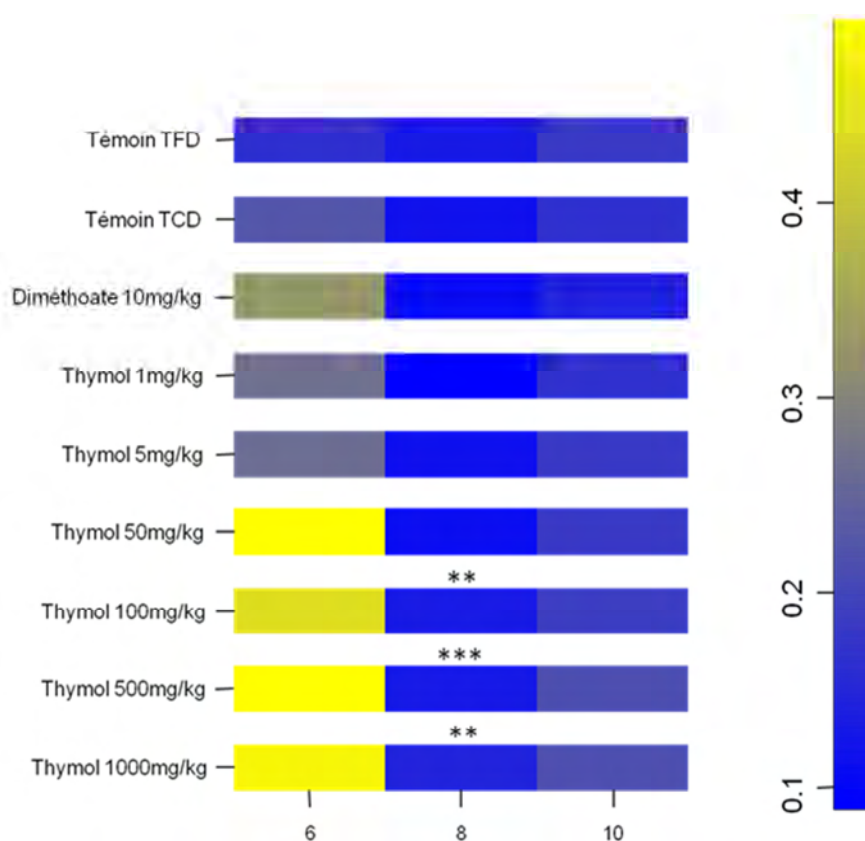


Figure 56 : Diagramme du niveau d'activité relative de la glucose deshydrogénase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activités significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (** P < 0,01).

III.7. Effet du thymol sur l'activité de la glutathion S-Transférase

La cinétique de l'activité de la GST établie chez les individus non exposés au thymol montre que l'activité de cette enzyme est relativement constante de la fin du stade larvaire (6^{ème} jour) jusqu'au stade prénympe (8^{ème} jour) (p-value = 0,09) ainsi qu'entre le stade prénympe et le stade nymphe aux yeux blancs (10^{ème} jour) (p-value = 0,85) (Figure 57).

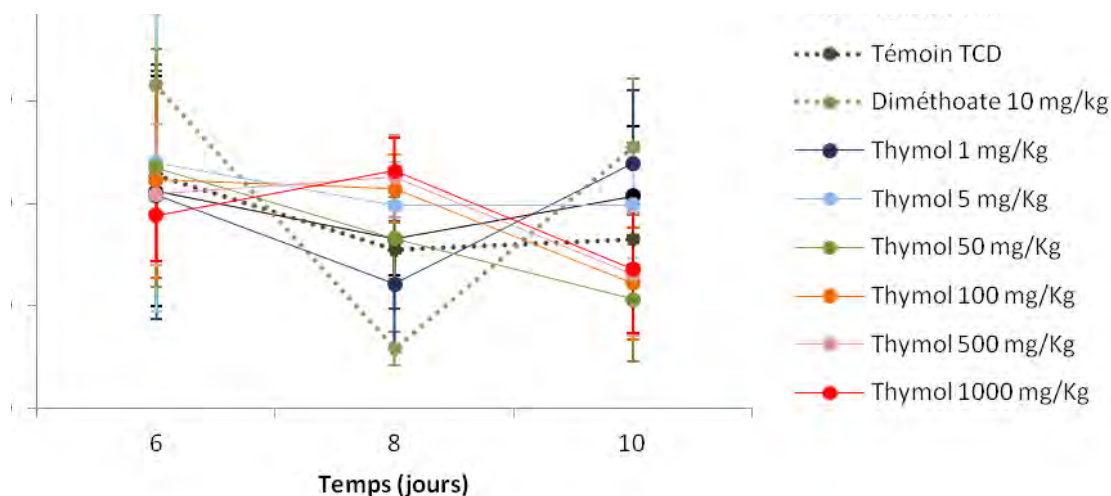


Figure 57 : Activité de la glutathion S transférase exprimée en unités relatives à la quantité de protéines totales au cours du développement larvaire et en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture.

L'analyse statistique de l'effet du thymol sur l'expression de la GST montre que l'activité de cette enzyme augmente significativement chez les individus exposés à des concentrations allant de 100 à 1000 mg de thymol/kg de nourriture (p -value < 0,01 ; p -value < 0,01 ; p -value < 0,001 respectivement) (Figure 58).

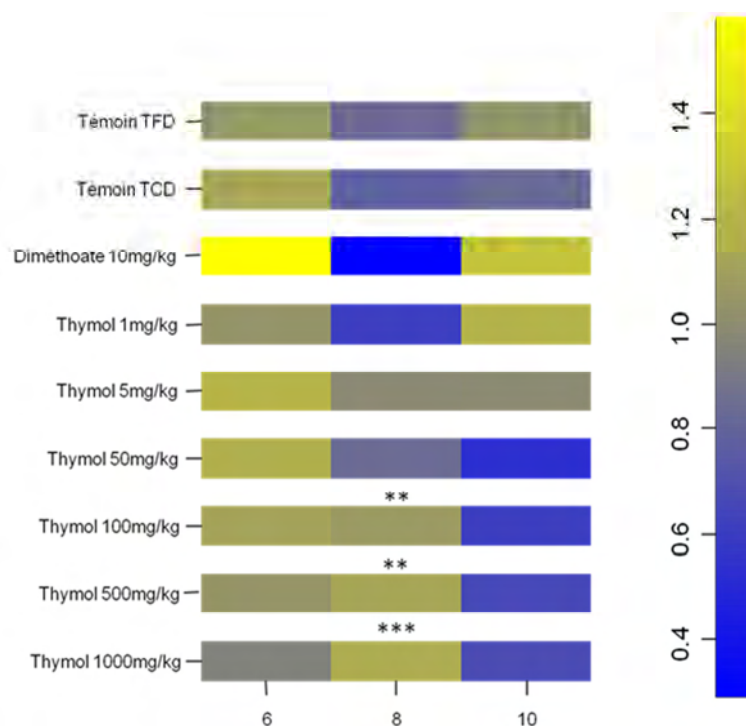


Figure 58 : Diagramme du niveau d'activité relative de la glutathion S transférase au cours du développement larvaire en fonction des différentes concentrations de thymol présent dans la nourriture. Les niveaux d'activité significativement différents de ceux retrouvés dans le témoin au même stade sont indiqués par un astérisque (P < 0,01).**

DISCUSSION

I. ÉLEVAGE *IN VITRO*

L'abeille domestique est un des principaux pollinisateurs des plantes et des arbres fruitiers entomophiles. L'impact de sa disparition serait désastreux pour l'agriculture et la biodiversité. L'abeille est pourtant soumise durant toute sa vie à de nombreux stress toxiques environnementaux et iatrogènes. La détermination du risque toxique encouru par les abeilles est donc une nécessité absolue pour sa protection. Ce risque est le fruit d'un rapport entre la toxicité d'un composé et les doses auxquelles les individus sont exposés. De nombreuses études se sont penchées sur la mesure des concentrations environnementales de nombreux composés potentiellement toxiques pour l'abeille. Mais force est de constater qu'à l'opposé, le nombre d'études visant à déterminer la toxicité de ces composés pour l'abeille est très limité. Les études portant sur la toxicité de composés iatrogènes, en majorité des acaricides, sont particulièrement peu nombreuses et aucune étude à notre connaissance n'a porté sur la toxicité des acaricides introduits dans la ruche au cours des traitements apicoles sur le développement larvaire.

La présente étude avait pour but de déterminer les toxicités aiguës et chroniques des résidus de thymol, un acaricide couramment employé dans la lutte contre *Varroa*, lorsque ceux-ci sont présents à l'état de résidus dans la cire et dans la nourriture larvaire. Pour la première fois à notre connaissance, cette étude proposait de déterminer à la fois les effets létaux et les effets sublétaux d'un composé au cours d'une exposition chronique. Ce travail a nécessité l'élevage d'un nombre d'individus bien supérieur aux 300 greffés dans la méthode originelle développée par Aupinel et al (2005) ou aux 500 prélevés dans la méthode présentée par Hendriksma et al (2011). Notre choix s'est porté sur la méthode d'élevage par greffage, qui a été préférée à la méthode en cupularve car cette dernière aurait nécessité l'emploi d'un trop grand nombre de ruches pour pouvoir élever les 1500 larves nécessaires à cette étude. Afin de pouvoir réaliser ce travail, la technique développée par Aupinel et *al.* a donc été adaptée de façon à pouvoir greffer ces larves sans les exposer trop longtemps à des conditions défavorables à leur développement.

Le succès de l'adaptation de la technique a été validé par un taux de mortalité avoisinant les 15% dans les groupes témoins et par une reproductibilité des effets létaux du thymol au cours d'une intoxication aiguë et chronique. De grands écarts-types ont cependant été obtenus lors des mesures des effets sublétaux du thymol sur le poids des larves, l'expression de gènes marqueurs de l'immunité et du développement et l'activité enzymatique. Ces variations sont en partie dues à des différences génétiques interindividuelles. Chez les insectes sociaux monogynes à reproduction polyandrique dont fait partie l'abeille, cette variabilité génétique au sein de la colonie est en effet nécessaire à leur survie et à leur adaptation aux fluctuations environnementales (Schmid-Hempel & Crozier, 1999 ; Mattila & Seeley, 2007). Par exemple, une étude menée sur des abeilles provenant d'une même colonie ou de

colonies différentes montrent que celles-ci présentent des différences d'activités à la fois intra et inter-colonie au niveau de leur métabolisme oxydatif en réponse à un stress induit par l'imidaclopride (Suchail et *al.*, 2001). Outre ces différences génétiques, les grands écarts types trouvés dans la présente étude peuvent être expliqués par la technique d'élevage *in vitro* utilisée lors de l'intoxication des larves. Les blessures causées aux larves lors de leur greffage peuvent en particulier induire une modification de leur réponse au stress (COLOSS, 2011). De plus, l'encagement de la reine pendant 30 heures induit une différence d'âge théorique entre les larves. Sachant qu'il faut entre 14 et 20 heures à une larve pour passer du stade L1 au stade L2, ces différences d'âges peuvent engendrer une différence de sensibilité à certains composés toxiques et organismes pathogènes (Davis et *al.*, 1988 ; Aupinel et *al.*, 2007). Aussi, des facteurs liés à la qualité et à la dynamique des colonies pourraient être impliqués dans la survie des larves greffées. Par exemple, les larves issues d'une colonie de taille importante auraient acquis une alimentation en gelée royale de meilleure qualité (Huang & Otis, 1991 ; Deseyn & Billen, 2005) ce qui pourrait avoir un impact sur la survie et le développement normal des larves élevées *in vitro* (observation personnelle). De plus, il a été démontré que les sécrétions des nourrices provenant des colonies de taille importante permettent d'éliminer de manière assez efficace les spores de la loque américaine *Paenibacillus larvae* (Graaf et *al.*, 2001). Le rôle de ces différences est d'autant plus important que la contamination de la nourriture larvaire par certains organismes pathogènes provenant de la ruche conduit généralement à la contamination des dispositifs d'élevage *in vitro*, ce qui met en péril les larves (COLOSS, 2011 ; Crailsheim et *al.*, 2013).

II. ANALYSES DES EFFETS LÉTAUX DU THYMOL

L'analyse des résultats de l'étude des effets létaux du thymol montre que toutes les concentrations testées allant de 200 à 5000 mg de thymol/kg de cire et de 500 à 3000 mg de thymol/kg de nourriture ont un effet significatif sur la mortalité larvaire. Les CL50 aigües du thymol dans ces deux matrices sont respectivement de 2100 mg de thymol/kg de cire et de 2000 mg de thymol/kg de nourriture. Ces deux valeurs sont très proches et relativement élevées ce qui semble indiquer que le thymol est un composé peu toxique pour les larves d'abeille au cours d'une exposition aigüe. De même, les DL50 aigüe du thymol *via* la nourriture, qui sont de 0,044 mg de thymol/larve, sont largement supérieures à celles d'autres pesticides administrés oralement. Par exemple, la DL50 aigüe par voie orale sur les larves d'abeilles au bout de 48 heures est de 0,00006 mg/larve pour la cyperméthrine, de 0,028 mg/larve pour l'endosulfan, de 0,00074 mg/larve pour le malathion, de 0,00027 mg/larve pour le methidathion, de 0,00044 mg/larve pour menvinphos et de 0,0014 pour le diméthoate (Hendriskma et al, 2011 ; Atkins & Kellum, 1986). Le thymol semble donc moins toxique que d'autres molécules neurotoxiques après une intoxication aiguë. De plus, la DL50 aigüe du thymol *via* la nourriture larvaire

est du même ordre de grandeur que celle obtenue pour ce composé par voie topique chez la chenille *Spodoptera litura* (Hummelbrunner and Isman, 2001), le coléoptère *Coleoptera elateridae* (Waliwitiya et al., 2005) ou le diptère *Drosophila melanogaster* (Karpouhtsis et al., 1998). Les larves d'abeilles ne manifestent donc pas une sensibilité particulière au thymol. Ces résultats sont en accord avec Hardstone & Scott, (2010) qui ont observé que bien que les abeilles aient moins de gènes de détoxification, celles-ci ne sont pas plus sensibles aux pesticides que les autres insectes.

Les CL50 chroniques sont quant à elles de 690 mg de thymol/kg de cire et de 700 mg de thymol/kg de nourriture. Ces valeurs, là encore très proches, mais plus faibles, indiquent que les larves sont plus sensibles au thymol lorsqu'elles sont chroniquement exposées à ce composé. Le ratio toxicité aiguë/toxicité chronique du thymol, qui est d'environ trois, est faible et semble indiquer pour sa part que la toxicité chronique du thymol pour les larves d'abeilles est, comme la toxicité aiguë, relativement faible.

Les effets létaux aigus et chroniques du thymol sont donc très similaires dans les deux matrices. Pourtant les multiples voies d'intoxication des individus exposés au thymol *via* la cire et *via* la nourriture larvaire sont différentes. Ces voies sont particulièrement complexes à déterminer lorsque les individus sont exposés au thymol *via* la cire. En effet, les larves L1 élevées *in vitro* sont greffées sur une petite quantité de gelée royale déposée dans le fond de la cupule en cire, ces larves flottent donc sur leur nourriture jusqu'au stade L3 à partir duquel les individus reposent dans le fond de la cupule. À partir de ce stade, les larves élevées dans des cupules contaminées sont donc exposées au thymol par voie topique. Mais dès son incorporation dans la cire, le thymol s'évapore dans l'air comme en témoigne la cinétique de disparition du thymol dans les cires contaminées après traitement des ruches (Bogdanov et al., 1998). Les larves sont donc également exposées aux vapeurs de thymol par voie respiratoire dès leur greffage. L'absence d'effet des vapeurs de thymol sur les individus témoins présents dans les mêmes dispositifs d'élevage à tous les stades semble cependant indiquer que cette voie d'intoxication est marginale. D'autre part, une étude a montré que jusqu'à 0,1% du thymol présent dans les alvéoles de cire pouvait diffuser passivement vers le miel qui y était conservé (Bogdanov et al., 1998). Malgré de nombreux renouvellements de nourriture larvaire au cours de l'élevage, il semble donc que la nourriture larvaire, dépourvue de thymol au moment de son introduction dans les cupules en cire, soit contaminée par diffusion à partir de la cire. Au contraire, la voie d'exposition des larves nourries avec de l'aliment contaminé est simple à déterminer. En effet, les larves exposées au thymol *via* la nourriture l'ont été dès leur greffage par voie orale à travers la nourriture absorbée, par voie respiratoire *via* l'évaporation du thymol présent dans la nourriture larvaire vers l'air ambiant et également par voie topique, *via* un contact direct avec la nourriture dès leur greffage jusqu'à la fin du stade larvaire. Une contamination de la cupule par la diffusion du thymol à partir de la nourriture larvaire vers cette dernière est exclue étant donné que des cupules en

plastique ont été employées à la place des cupules en cire, notamment pour parer à cette éventualité. L'absence d'effet des vapeurs du thymol sur les témoins présents dans le même dispositif d'élevage semble indiquer que cet effet est négligeable au regard des quantités absorbées par voie orale. De même, la voie topique semble être de plus faible importance que la voie orale jusqu'à la fin du stade larvaire. Cette hypothèse est appuyée par la valeur de la DL50 aigüe à 24 h du thymol par voie topique uniquement, qui est de 0,15 mg/larve (Gashout & Guzmán-Novoa, 2009) et qui a été calculée après dépôt et absorption immédiate d'une goutte d'une solution de thymol dissout dans de l'acétone à la surface de larves L5. Comparativement à l'acétone, la gelée royale est en effet un mauvais transporteur percutané, la fraction de thymol qui traverse la cuticule est donc négligeable en comparaison aux grandes quantités de thymol absorbées par voie orale.

En résumé, les individus élevés dans les cupules en cire contaminée sont intoxiqués majoritairement par voie orale jusqu'au stade L3, puis l'intoxication a lieu à la fois par voie orale et par voie topique jusqu'au stade nymphe, pendant lequel l'intoxication a lieu majoritairement par voie topique. Au contraire, pour les individus exposés *via* la nourriture, la voie orale semble être la voie d'intoxication majoritaire des larves. Les nymphes ne sont plus exposées au thymol à partir de la fin du stade larvaire qui correspond à la consommation de la totalité de la nourriture contaminée.

Quelle que soit la voie d'exposition, dans les deux matrices une forte mortalité larvaire est observée endéans les 48 premières heures d'expositions, dès la concentration 200 mg de thymol/kg de cire et dès la concentration 500 mg de thymol/kg de nourriture. Au contraire, dans les deux matrices, le thymol semble moins toxique pour les nymphes, car seules les concentrations 2000 mg de thymol/kg de cire et 1000 et 3000 mg de thymol/kg d'aliment induisent une mortalité nymphale significative. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vivo* par Mattila et *al.* (2000) qui observent que le traitement Apiguard® est beaucoup plus létal s'il est appliqué sur des cadres de couvain contenant des jeunes larves que s'ils contiennent des nymphes ou des adultes. Dans notre étude, la faible sensibilité des nymphes au thymol est à mettre en relation d'une part avec le phénomène de sélection pour la résistance au thymol qui entre en jeu dès le début du stade larvaire et sélectionne positivement les individus les plus résistants et d'autre part avec la faible exposition des nymphes dans les deux matrices. De plus, la sensibilité des individus aux composés toxiques est en partie due à la présence de récepteurs à ces composés. Ainsi, les larves d'abeilles sont plus sensibles aux composés neurotoxiques qui, comme le diméthoate, ciblent des récepteurs du système nerveux présents dès leur éclosion (Aupinel et *al.*, 2007). Une intoxication massive au regard de la taille de la larve a alors lieu au stade L1. Au contraire, d'autres composés, comme le fénoxy-carbe qui inhibe l'effet des hormones juvéniles avant l'émergence de l'adulte, ne sont pas toxiques pour les larves d'abeilles mais sont très toxiques pour les nymphes à l'émergence (Aupinel et *al.*, 2007). Les profils de mortalité obtenus dans cette étude indiquent donc que la toxicité larvaire du thymol s'exprime durant tout leur développement. Les

mécanismes biologiques à l'origine de cette toxicité sont inconnus. Cependant, comme le diméthoate, le thymol est connu pour ses effets neurotoxiques chez les insectes. Plusieurs récepteurs de cette molécule dans les cellules nerveuses ont été décrits dans ce groupe taxonomique *e.g.* récepteur de l'acide γ -aminobutyrique (GABARs), récepteur sensoriel (TRP), récepteur de la tyramine (TyrR) (Priestley et *al.*, 2003 ; Enan et *al.*, 2005 ; Parnas et *al.*, 2009). Ces récepteurs sont ainsi capables de fixer le thymol et sont susceptibles d'intervenir dans ce phénomène. L'activité insecticide du thymol en particulier est liée chez la drosophile à son action agoniste sur le récepteur de la tyramine (Enan, 2005). Bien que la cinétique d'expression du récepteur à la tyramine soit inconnue chez la larve d'abeille, ce récepteur pourrait être directement à l'origine de la toxicité du thymol au cours du développement larvaire. La tyramine est en effet mortelle pour les larves à partir de 0,3 mg/larve lorsqu'elle est produite par la bactérie de la loque européenne, *Melissococcus pluton* (Kanbar et *al.*, 2004). En se fixant sur son récepteur dans la larve, le thymol pourrait mimer ses effets.

D'après Imdorf et *al.* (1995) et Matila et *al.* (2000), le thymol n'induit pas de mortalité chez l'adulte après traitement. Pourtant, la comparaison de la DL50 aigüe du thymol chez la larve *via* la nourriture (0,044 mg/individu) à la DL50 aigüe du thymol appliqué topiquement chez l'adulte (0,055 mg/individu) montre que ces deux DL50 sont très proches (Thompson et *al.*, 2013). Cette apparente discordance entre des DL50 proches chez l'adulte et chez la larve et l'absence de mortalité observée chez les adultes, pourrait à notre sens être liée à la possibilité pour les adultes de fuir les cadres les plus exposés au traitement, voire de quitter la ruche alors que les larves sont contraintes de rester sous les bandelettes imprégnées, exposées aux plus fortes concentrations de thymol. C'est d'ailleurs ce qui est couramment observé après application du traitement. Les adultes quittent les cadres situés juste en dessous des bandelettes et déplacent le couvain vers les cadres les moins exposés (Imdorf et *al.*, 1995). La toxicité du thymol ne semble donc pas varier en fonction des stades de développement de l'abeille. L'ensemble de ces résultats indiquent que le thymol est faiblement toxique pour les larves d'abeilles quel que soit le stade étudié ou la matrice contaminée. Cette toxicité est plus forte pour les individus les plus jeunes qui sont relativement plus intoxiqués au regard de leur petite taille. Elle est également plus forte lorsque l'exposition est chronique bien que cette toxicité reste faible comparativement à celle d'autres composés.

III. ANALYSES DES EFFETS SUBLETAUX DU THYMOL

Dans cette étude, le gène ribosomal de référence choisi rp-49 présente de faibles variations d'expression aussi bien lors du développement larvaire que lors des tests d'intoxication au thymol. Une étude antérieure a aussi montré une stabilité de ce gène lors du développement larvaire, contrairement à une intoxication à l'hormone juvénile III qui, elle, induit des variations significatives

de son expression (Lourenço et *al.*, 2008). Ceci peut être mis en relation avec le fait que ce gène varie lors d'un stress de l'individu. Nos résultats montrent que l'expression du rp-49 ne fluctue pas lors d'un stress par une exposition au thymol. Au vu des résultats obtenus ici, le gène rp-49 peut être considéré comme gène de référence candidat lors des études de toxicité par le thymol.

L'examen de l'expression différentielle des gènes étudiés ici lors des intoxications par des concentrations létales de thymol allant jusqu'à 50 mg/Kg d'aliment montre une variation significative de la vitéllogénine. Ces différences d'expression sont également accompagnées par des effets sur le poids larvaire ainsi que les activités enzymatiques recherchées au 6 et 8^{ème} jour d'intoxication. En revanche, les larves traitées par des doses sublétales de thymol ne montrent pas de sensibilité significative à ce traitement au stade 2 de leur développement.

Après 6 jours de développement, les larves exposées à de fortes concentrations de thymol censées avoir consommé la totalité de leur alimentation montrent également une diminution significative de leur poids, vraisemblablement liée à un arrêt d'alimentation, comme en témoigne la nourriture restante dans les cupules. Ce résultat pourrait se traduire par un effet neurotoxique induit par les fortes concentrations de thymol. En effet, plusieurs études ont montré les effets neurotoxiques engendrés par l'exposition à cette molécule parmi lesquels la diminution de la phototaxie chez l'abeille adulte (Bergougnot et *al.*, 2013) ou la diminution de la fréquence de battement des ailes chez la mouche à viande de l'espèce *Phaenicia sericata* (Waliwitiya et *al.*, 2010).

Les effets neurotoxiques supposés à l'origine de la perte de poids des larves exposées à de fortes concentrations de thymol dans la présente étude pourraient éventuellement se traduire par un ralentissement de la contraction musculaire notamment des muscles du tractus digestif. Ce ralentissement empêcherait un transit normal de la nourriture ou encore entraînerait un laxisme musculaire réduisant la mouvance de la larve à la quête d'alimentation. D'autres scénari peuvent également être imaginés, en particulier liés à une répulsion olfactive de la larve envers une alimentation fortement intoxiquée. Plusieurs études soulignent l'importance de la qualité de nourriture pour le développement et la viabilité des nymphes et la capacité des futurs adultes à voler et à se reproduire (Brodschneider et *al.*, 2009 ; Brodschneider & Crailsheim, 2010 ; Coloss, 2010).

Par ailleurs, plusieurs autres effets métaboliques et/ou physiologiques peuvent également être à l'origine de la perte de poids observée à ce stade. En effet, des variations significatives de l'expression du gène du lysozyme impliqué dans l'immunité sont notées à la concentration d'intoxication maximale de 1000 mg/kg d'aliment. Ces effets sont cependant plus difficiles à confirmer étant donné la diminution de l'expression de la phénol oxydase. Lors d'une réaction immunitaire, tous les effecteurs se retrouvent sur exprimés pour agir fortement et en même temps. De plus, les données collectées pour ces deux gènes sont non linéarisables, et ne sont pas suffisantes à eux seuls pour attester de tels effets.

Par ailleurs, il est intéressant de constater que l'expression du gène de la vitellogénine fluctue considérablement en fonction du temps pour des concentrations sublétales pouvant aller jusqu'à 50 mg/kg d'aliment. À la fin du stade larvaire (jour 6), une diminution significative de l'expression de ce gène est observée pour les concentrations allant de 500 à 1000 mg/kg d'aliment. Ces résultats concordent avec ceux de Boncristiani et *al.*, (2012) qui ont testé parmi une cinquantaine de gènes étudiés, et observé entre autres une diminution du niveau d'expression de la vitellogénine chez l'abeille adulte après exposition au thymol. La variation d'expression de cette protéine, ayant des effets pléiotropiques dans l'homéostasie individuelle et sociale de l'abeille, aurait sur elle des effets délétères (Amdam et *al.*, 2005 ; Guidugli et *al.*, 2005a ; Nelson et *al.*, 2007).

Des modifications d'expression à des concentrations sublétales sont aussi observées après 8 jours d'intoxication. Durant le stade de prénymphe, nous observons un pic d'expression de la vitellogénine au jour 8 pour les concentrations allant de 50 à 1000 mg de thymol/kg d'aliment. Ce résultat est complètement inverse à celui obtenu pour le témoin solvant élevé dans le caisson contaminé, pour lequel un maximum d'expression de la vitellogénine au jour 6 et une diminution d'environ 10 fois au jour 8 sont observés.

L'expression de la vitellogénine est en accord avec les résultats de Guidugli et *al.*, (2005b) où une forte augmentation de l'expression de la vitellogénine est notée durant la fin du stade larvaire contre une expression quasi nulle au stade de prénymphe. Le pic d'expression enregistré au jour 8 pour les larves intoxiquées pourrait s'expliquer par un retard de développement larvaire du jour 6 au jour 8 soient environ 48 heures. En effet, au jour 6 l'essentiel du développement larvaire est censé être atteint, ce qui marque le passage au stade de prénymphe. L'exposition au thymol semble alors avoir des effets de retard de développement témoignés par le délai d'induction de l'expression du gène de la vitellogénine impliqué dans l'expression des réserves protéiques. Il est ainsi intéressant de tester l'hypothèse formulée par Guidugli et *al.*, (2005a) ; Rachininsky et *al.*, (1990) sur le lien de l'expression de la vitellogénine avec l'altération du mécanisme d'hormone juvénile responsable du changement de stades de développement.

Durant ce même stade de pré nymphe, une augmentation de l'activité de la glutathion S-transférase est observée suite à une intoxication chronique à des concentrations de thymol allant de 100 à 1000 mg/kg d'aliment par rapport au témoin négatif. Ces résultats sont non linéarisables mais concordent tout de même avec les résultats de Loucif-Ayad et *al.*, (2008) qui montrent une augmentation de l'activité de cette enzyme lors d'un traitement des ruches avec Apiguard® chez des abeilles adultes. Ces mêmes résultats montrent une activation du système de détoxification de phase II après une exposition au thymol à partir du stade de prénymphe jusqu'au stade adulte. Aucune variation pendant le stade larvaire n'a été rapportée. Une autre étude montre au contraire qu'aucun effet du thymol sur l'expression de la glutathion S transférase S3 n'est induit chez des abeilles adultes. Un effet du thymol

au niveau du système de détoxification de la phase I est tout de même observé avec une expression importante des Cytochromes P450 4G11 et des protéines kinase 1 chez l'adulte. L'activation du système de détoxification de phase I est également nécessaire, à l'activation du système de détoxification de phase II. Au vu de ces constats, il serait donc intéressant d'effectuer une analyse complète du profil d'expression des gènes des GST et de déterminer leur éventuelle implication dans le processus de détoxification. En effet, la prise en charge du thymol par le système de détoxification a été démontré par l'étude de Passreiter et *al.*, (2004) où un métabolite secondaire du thymol, le 3-O- β -glucoside est retrouvé dans les excréments de *Spodoptera litura* et de *Spodoptera Trichoplusia*. Cette hypothèse a été récemment controversée par l'étude de Johnson et *al.*, (2013) où trois inhibiteurs du système de détoxification ont été testés à savoir le piperonyl butoxide (PBO) qui inhibe les cytochromes P450, le S,S,S-tributylphosphorotrithioate (DEF) qui inhibe les carboxylestérases et le diethyl maleate (DEM) qui inhibe les glutathion S-transférases. Aucune augmentation de la toxicité du thymol sur les abeilles n'a été enregistrée lors de l'ajout de ces inhibiteurs. Cela supposerait que le système de détoxification testé ne serait pas impliqué dans la tolérance des abeilles au thymol ou, qu'en cas d'inhibition d'un de ces systèmes, d'autres systèmes de détoxification tels que les MXR (multixenobiotic resistance) peuvent prendre le relai (Özvegy et *al.*, 2001; Faria et *al.*, 2011).

Au cours du stade de pré-nymphe, une augmentation de l'activité de la glucose déshydrogénase a également été observée lors de la présente étude pour des concentrations de thymol allant de 100 à 1000 mg/kg de nourriture. Une augmentation de l'expression de l'abaecine pour la concentration en thymol de 1000 mg/kg de nourriture et une augmentation de l'expression du lysozyme à une concentration de 100 mg/kg de nourriture ont également été observées. Même si ces résultats sont non linéarisables, il est probable que le thymol induise une stimulation du système immunitaire par voie humorale et cellulaire. Cette stimulation semble se produire au cours du développement larvaire. En effet, dans les travaux de Boncristiani et *al.*, (2012) aucune variation de l'expression du gène de l'abaecine chez les abeilles adultes n'a été observée. De plus, une diminution de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire a été notée. Le croisement de ces résultats avec les nôtres semble aller dans le sens d'une stimulation différentielle du système immunitaire entre le stade larvaire et le stade adulte chez l'abeille après exposition au thymol. Ce résultat est d'autant plus confirmé par l'augmentation de l'activité de la glucose déshydrogénase, un marqueur de l'immunité cellulaire (Lovallo & Cox-Foster, 1999), obtenue au cours du stade larvaire lors de la présente étude. D'autres effets cytotoxiques du thymol ont été observés comme l'induction de l'apoptose des cellules dendritiques de souris (Xuan et *al.*, 2010) et des aberrations chromosomiques dans des lymphocytes humains et sur des cellules de moelle osseuse de rat (Azirak & Rencuzogullari, 2008 ; Buyukleyla & Rencuzogullari, 2009).

En conclusion, l'ensemble de ces données sur l'intoxication chronique à des doses sublétales suggère que le thymol induit des effets neurotoxiques sur la capacité des larves à s'alimenter. D'autres systèmes tels que celui de la détoxification et du développement peuvent également être affectés. Contrairement à l'étude de la toxicité létale du thymol qui est surtout observée pendant les 2 et 6 premiers jours d'intoxication, les effets sublétaux du thymol sont observés à la fin du stade larvaire et durant la transition entre la larve et la nymphe. Des effets similaires sont retrouvés chez d'autres insectes avec des huiles essentielles contenant du thymol ou différents monoterpènes. À titre d'exemple, Sangkyun et *al.*, (1999) ont montré que les monoterpènes ont un effet de diète à la fin du stade larvaire chez *Ostrinia nubilalis* et induisent un retard de développement. Akhtar et *al.*, (2004) ont montré des effets répulsifs et inhibiteurs de croissance larvaire des composants d'huiles essentielles sur différentes espèces d'insectes (*e. g. Trichoplusia ni* ; *Pseudaletia unipuncta* ; *Pseudaletia* ; *Xylostella* ; *Epilachna varivestis*).

L'ensemble des effets létaux et sublétaux obtenus après intoxication au thymol sont synthétisés dans la figure 59.

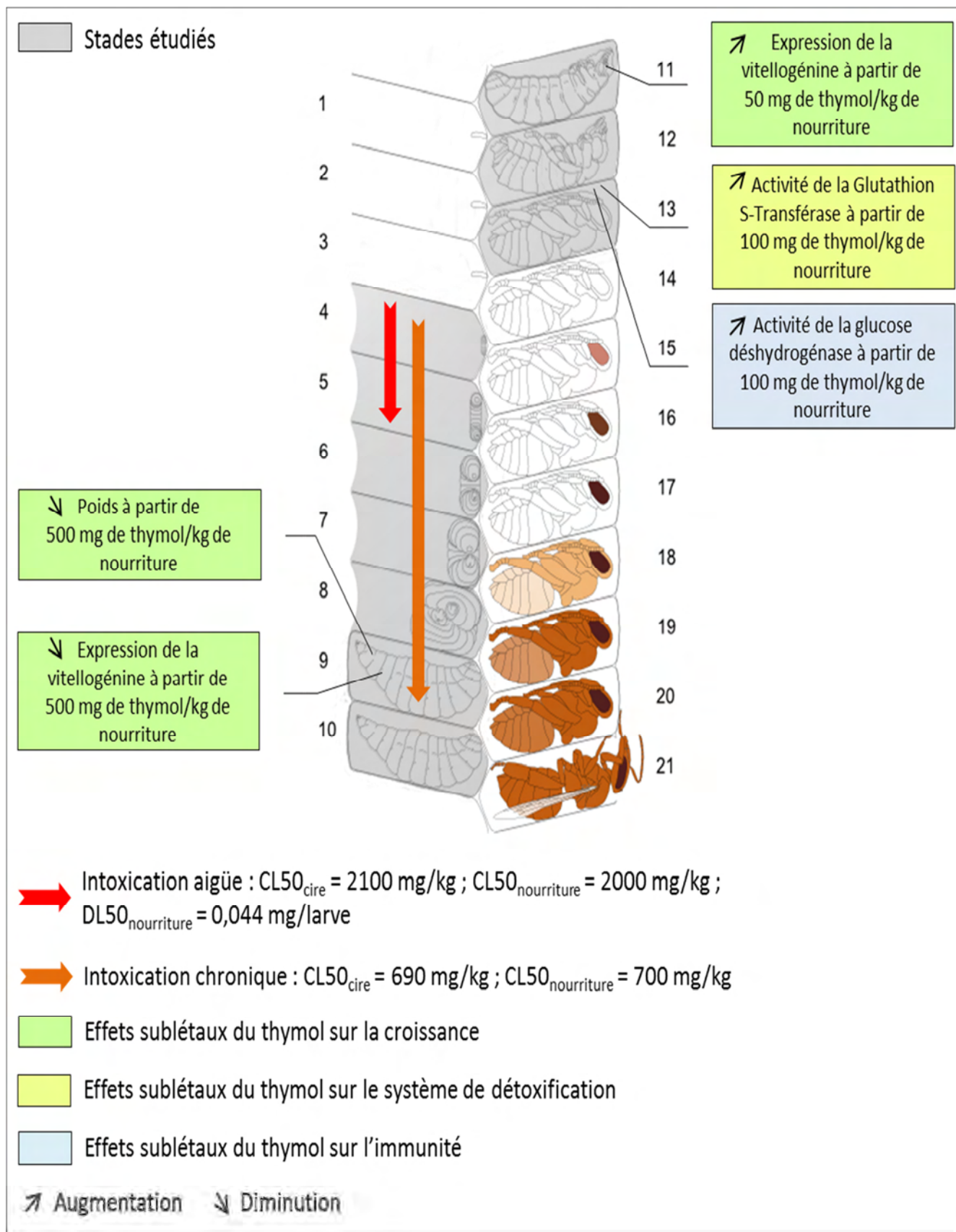


Figure 59 : Schéma récapitulatif des principaux résultats de cette étude réalisée d'après le dessin du développement de l'abeille par Adam Tofilski (www.honeybee.drawwing.org).

I. ÉTUDE DU RISQUE ENCONTRÉ PAR LES ABEILLES AU COURS DE LEUR DÉVELOPPEMENT LARVAIRE DU AUX RÉSIDUS DE THYMOL PRÉSENTS DANS LA CIRE ET LA NOURRITURE

L'évaluation du risque d'intoxication lié au thymol a été réalisée par comparaison des données de toxicité obtenues au cours de cette étude avec les données disponibles dans la littérature sur les résidus de thymol retrouvés dans les cires et dans la nourriture larvaire après les traitements apicoles. Ces niveaux de résidus sont très variables. Ainsi, après deux semaines de traitement avec Apilife Var[®], Bogdakov et *al.*, (1998) retrouvent de 662 à 4753 mg de thymol/kg de cire. Plus récemment, Floris et *al.*, (2004) retrouvent après un traitement de deux semaines avec d'une part Apilife Var[®] et d'autre part Apiguard[®], respectivement $21,6 \pm 13$ mg de thymol/kg de cire et $147,7 \pm 188,9$ mg de thymol/kg de cire. Ces différences entre les moyennes et les très grands écarts types qui y sont associés pourraient être dues à l'influence importante des conditions de température au moment du traitement sur le niveau et la durée de saturation en thymol de l'air de la ruche. Les précautions d'emploi stipulent d'ailleurs que le traitement ne doit pas être appliqué si la température extérieure est inférieure à 15°C ou supérieure à 35°C. Quoi qu'il en soit, la comparaison des concentrations environnementales de thymol dans la cire après traitement par Apilife Var[®] à la CL50 aigüe du thymol dans la cire chez la larve, révèle que ces concentrations peuvent atteindre ou dépasser la CL50. De même, les concentrations en thymol de la cire après traitement avec Apiguard[®] sont en moyenne égales à celles qui induiraient dans notre étude une mortalité larvaire d'environ 20%. Il apparaît donc que malgré une CL50 du thymol dans la cire élevée, les résidus de thymol retrouvés dans cette matrice après traitement peuvent atteindre des seuils très élevés et dépasser le seuil de toxicité pour les larves. Ces résultats sont concordants avec ceux de deux études récentes menées *in vivo* qui ont mis en évidence les effets sublétaux de la cire lorsqu'elle est contaminée par de multiples résidus d'insecticides et d'autres acaricides, sur le développement des larves d'abeilles et sur les adultes (Orantes-Bermejo et *al.*, 2010 ; Wu et *al.*, 2011).

A l'inverse de la cire, il n'existe aucune donnée concernant les concentrations environnementales de thymol dans la nourriture larvaire. Mais, il est établi que le thymol peut s'accumuler dans le miel ou le pollen (Bogdanov et *al.*, 1998) et que d'autres acaricides, comme le coumaphos et le fluvalinate, s'accumulent dans la gelée royale (Smodis Skerl, 2010). Il est donc raisonnable de penser qu'une accumulation de thymol est possible dans la gelée royale au cours du traitement et que les larves peuvent être exposées au thymol par voie orale. Mais cette voie semble marginale au regard des concentrations de vapeurs de thymol présentes dans la ruche au moment du traitement, vapeurs susceptibles d'être inhalées par la larve. En dehors des périodes de traitement, l'exposition des larves au thymol *via* la gelée royale contaminée n'est en revanche pas négligeable. La quantité de résidus de

thymol absorbée par les larves dans ces circonstances peut être estimée à partir des données de la littérature. L'alimentation larvaire est en effet constituée de gelée royale pure pendant 3 jours, puis d'un mélange de gelée royale, de miel et de pollen appelée bouillie larvaire, pendant les deux jours suivants (Brouwers *et al.*, 1987 ; Asencot & Lensky, 1988). Les quantités de résidus de thymol dans la gelée royale sont inconnues. Dans le pollen, les résidus de thymol sont présents à une concentration allant de 0,037 à 39,7 mg/kg (Rennich *et al.*, 2012) et dans le miel les résidus de thymol sont présents selon les études à une concentration allant de 2,07 à 7,54 mg/kg (Bogdanov *et al.*, 1998), de 0,4 à 8,8 mg/kg (Floris *et al.*, 2004) ou de 0,75 à 8,2 mg/kg (adamczyk *et al.*, 2005). Durant tout son développement, la larve consomme 75,2 mg de miel et 5,4 mg de pollen (Rortrais *et al.*, 2005). La larve peut donc ingérer jusqu'à 0,0002 et 0,0006 mg de thymol via le miel et le pollen respectivement soit une quantité totale de 0,0008 mg. La LOEL du thymol dans la nourriture larvaire est de 50 mg/kg, soit une dose de 0,018 mg/larve. Cette dose est cent fois supérieure à celle absorbée par les larves *via* le pollen et le miel. Bien que les niveaux de résidus de thymol dans la gelée royale soient inconnus, il est donc raisonnable de penser que contrairement à la cire, l'exposition des larves *via* la nourriture en dehors des périodes de traitement ne présente pas de risque pour celles-ci attendu les très faibles quantités de résidus présents dans cette matrice.

II. CONCLUSION

Cette étude réalisée, grâce à la méthode d'élevage mise au point par l'équipe d'Aupinel *et al.*, (2005), et adaptée dans ce travail pour la circonstance, a permis d'évaluer, pour la première fois à notre connaissance, à la fois les effets létaux et sublétaux des résidus d'un pesticide iatrogène, le thymol, sur le développement larvaire. Les modifications de la méthode d'élevage larvaire originelle, comme l'homogénéisation de la répartition des individus à l'échelle de chaque dispositif d'élevage, l'utilisation de pastille Micropur® fort en lieu et place du methyl benzethonium chloride dans les cotons humidificateurs, sont autant d'améliorations qui ont contribué au succès de ce travail. Il a pu ainsi être établi que le thymol était un composé moyennement toxique pour les larves d'abeilles exposées de manière aiguë ou chronique *via* la cire ou la nourriture. Ce composé a en revanche des effets sublétaux sur le développement larvaire entraînant à la fois un retard de croissance et probablement une activation de certains gènes impliqués dans l'activation du système immunitaire. Compte tenu des concentrations très élevées des résidus de thymol, trouvées en particulier dans la cire, ce composé présente donc malgré sa toxicité moyenne, un danger pour les abeilles au cours de leur développement larvaire. Ce danger est particulièrement grand pour les jeunes larves, relativement plus exposées que les autres au regard de leur petite taille.

PERSPECTIVES

L'étude présentée dans ce manuscrit est la première à notre connaissance à avoir mis en évidence à la fois les effets létaux et sublétaux d'un composé sur un organisme à différents stades et ce, suite à une exposition ayant eu lieu au cours du développement larvaire. Une partie de ces travaux a été valorisée par une publication dans « *Pest Management Science* » une revue à comité de lecture A (Annexe 3).

Ce travail qui a suscité énormément d'attentes de la part de la profession apicole ouvre ainsi des perspectives nouvelles pour l'évaluation des dangers encourus par les colonies.

Depuis environ 20 ans, les apiculteurs subissent annuellement des pertes parfois massives de colonies et le nourrissage pendant la mauvaise saison autrefois très occasionnel est désormais d'usage. A la suite de ces épisodes de pertes, parfois pratiquement totales et catastrophiques pour la santé financière des exploitations, les apiculteurs victimes ont comme seul recours la possibilité d'une analyse des abeilles mortes et des produits de la ruche afin de tenter d'identifier l'organisme pathogène ou le composé à l'origine du drame. Malheureusement, il est très rare qu'un coupable unique, présent en quantité massive, puisse être désigné tant les organismes pathogènes présents dans la colonie et les composés toxiques, contaminant aussi bien les individus que les produits de la ruche, sont nombreux. Les composés potentiellement toxiques en particulier, présents dans l'immense majorité des cas à l'état de traces, sont rarement désignés comme impliqués dans la perte des colonies. Leur seuil est bien souvent jugé trop bas pour avoir induit un effet et les potentiels phénomènes de synergie ne sont jamais mis en cause. Ces phénomènes restent en effet très mal connus et difficiles à appréhender et seules quelques équipes de recherche tentent de les caractériser. Parmi les produits de la ruche analysés, la cire en particulier est, du fait de sa nature hydrophobe et de sa pérennité dans la colonie, très souvent chargée de multiples résidus. La réutilisation de ces cires d'opercules ou de corps après les épisodes de pertes, et plus généralement leur recyclage pour la fabrication de cire gaufrée, pose donc un véritable problème. Le label « bio » de certaines cires gaufrées reste à l'heure actuelle la seule démarche destinée à en garantir la qualité.

L'étude décrite dans cette thèse a démontré qu'il était à présent possible, grâce à la méthode d'élevage mise au point par l'équipe d'Aupinel et *al.*, (2005) et adaptée dans cette étude pour la circonstance, d'évaluer à la fois les effets létaux et sublétaux d'une cire sur le développement larvaire. Cette méthode peut sans doute être améliorée, par exemple en encageant la reine 12 h seulement afin de réduire la variance de l'âge des individus prélevés et, par là-même, la variance des paramètres mesurés dans l'étude des effets sublétaux, ou encore par l'utilisation d'un plus grand nombre de colonies afin de mieux cerner la variance inter-colonies. Mais plus important, l'application en routine de ce type d'analyse permettrait d'évaluer en une seule étape la qualité d'une cire et de déterminer si celle-ci peut ou non être recyclée en cire gaufrée. Cette information, d'intérêt majeur à la fois pour les ciriers et les apiculteurs, pourrait permettre la mise en place d'un label de qualité garantissant la non-toxicité des cires pour la colonie. Bien sûr, la faisabilité de ce type d'analyse dépend directement de son coût, c'est

pourquoi une rapide estimation de celui-ci a été réalisée et présentée en Annexe 1 de ce document. Le coût de cette analyse, dans sa forme la plus simple, consistant à élever des larves *in vitro* dans la cire à tester et à effectuer un suivi de la mortalité, de la croissance pondérale et de la métamorphose, a été évalué à 45 euros hors charges. Ce montant est à notre sens suffisamment faible pour que cette proposition fasse l'objet d'une étude de marché.

Au-delà de l'intérêt pour la profession apicole, l'intérêt scientifique d'une telle évaluation serait la constitution d'une base de données à double entrée, compilant à la fois les données obtenues *via* l'analyse des résidus dans les cires et celles obtenues *via* l'analyse *in vitro* des effets toxiques de ces cires sur le développement larvaire. L'exploitation de cette base de données pourrait notamment permettre de mieux caractériser les synergies toxiques pour l'abeille, ayant lieu entre les résidus de pesticides présents dans les cires à l'état de traces.

De plus, ce type d'analyse pourrait également, dans sa forme la plus complète, servir à la détermination des effets létaux et sublétaux d'un produit phytosanitaire (PP) au cours de son évaluation. En effet, à l'heure actuelle, l'analyse officielle de la toxicité d'un composé sur l'abeille, partie intégrante du processus d'évaluation en vue de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché d'un PP, consiste d'abord à déterminer le quotient de risque de ce composé à travers la détermination de sa DL50 aigüe à 48 h *via* un test en cage Pain sur des abeilles adultes exposées topiquement et oralement. Cette DL50 est ensuite comparée à la concentration environnementale prédite (PEC). Si cette DL50 est 50 fois plus forte que la PEC, alors le PP est considéré comme sans danger pour l'abeille ; si elle est moins de 50 fois plus forte, elle est alors définie comme potentiellement dangereuse. Dans ce dernier cas, un test en tunnel réalisé sous serre sur un champ expérimental traité avec le PP permet d'étudier les effets sublétaux de ce PP sur la colonie. À aucun moment au cours de cette méthode officielle, une évaluation de la toxicité de ce PP sur les abeilles au stade larvaire n'est donc réalisée. Récemment, l'équipe d'Aupinel et *al.* (2009) a entamé une série de démarches visant à intégrer les tests de toxicité aigüe sur larves d'abeilles dans le processus d'évaluation des PP. La reproductibilité de la technique d'élevage *in vitro* a ainsi été étudiée au cours d'un ring test² effectué par 7 laboratoires différents à travers l'étude de la toxicité du diméthoate. Cette étude a permis de démontrer la reproductibilité de cette technique au sein et entre les laboratoires. Nous proposons ici que l'analyse d'un certain nombre de marqueurs des effets sublétaux des PP en cours d'évaluation soit intégrée à cette démarche. Comme précédemment, le coût mais aussi le temps nécessaire pour la réalisation d'une telle évaluation ont été estimés et les montants sont présentés en annexe 2 de cette thèse. Le coût de cette étude est évalué à 62 000 euros en investissement pour une

² Comparaison inter-laboratoires visant à évaluer la reproductibilité d'une méthode et la capacité des laboratoires testés à la mettre en œuvre.

structure non équipée, auxquels s'ajoutent le salaire d'un technicien compétent à temps complet pendant 2 mois et 1250 euros de consommable pour l'évaluation de 5 marqueurs enzymatiques.

Pour terminer, un quasi-consensus est né dans la communauté scientifique étudiant l'abeille sur la nécessité de réévaluer la toxicité des pesticides en général, et des PP en particulier, en intégrant la mesure de leurs effets sublétaux sur les abeilles. Longtemps considérée comme impossible, cette mesure peut à présent être effectuée grâce à de nouvelles méthodes, telles que décrites dans cette étude et dans celle de Decourtye et *al.* (2011), respectivement sur la croissance larvaire et l'orientation des butineuses. A n'en pas douter, ces méthodes qui ont fait la preuve de leur efficacité seront bientôt intégrées dans un nouveau processus d'évaluation étendu de la toxicité des pesticides.

Par ailleurs, il est également important de souligner que l'évolution des procédures d'évaluation du risque des effets des pesticides (notamment sublétaux) ainsi que l'optimisation des techniques d'élevage *in vitro* devraient s'étendre également aux autres espèces pollinisatrices. En effet, les différences biologiques interspécifiques sont notables et l'utilisation de l'abeille comme seul modèle biologique pourrait être insuffisant pour couvrir ces différences. Ce fait est considérable du fait que des études antérieures ont montré que le mode de butinage chez le bourdon, différent de celui de l'abeille domestique a des conséquences sur l'évaluation et les mesures de gestion de risque de leur exposition aux pesticides (Thompson & Hunt, 1999). Rappelons ici que les abeilles sauvages ainsi que les bourdons jouent un rôle pollinisateur de même importance que l'abeille domestique.

Les effets létaux et sublétaux du thymol sur l'expression des gènes impliqués dans les réponses immunitaires et le développement montrent dans le présent travail que celle-ci présente une signature vraisemblablement reliée aux changements de stades de développement (ici jour 6 et jour 8). Ce changement d'expression réconforté par le changement pondéral est franchement témoigné par la vitellogénine. Cette protéine pléiotropique est en lien avec différents systèmes comme le développement, la reproduction et le temps de vie grâce à son interaction avec le système hormonal (Münch et *al.*, 2008 ; Remolina & Hughes, 2008). Il est ainsi intéressant de poursuivre cette étude par le dosage des différentes hormones via immunoradioactivité afin de déterminer les effets du thymol sur le développement de l'abeille (Bloch et *al.*, 2000). Une baisse de l'expression de la vitellogénine induit une diminution de la capacité de reproduction des abeilles qui peut être observée par une réduction du nombre et de la taille des ovocytes matures (Bloch et *al.*, 2000).

Certaines hormones comme les œstrogènes sont impliquées dans la croissance *via* une forte multiplication cellulaire nécessitant la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme comme la glycolyse, la voie des pentose phosphate et la production de lactate (Tennessen et *al.*, 2011 ; Tennessen & Thummel, 2011). La détermination de l'expression du récepteur aux œstrogènes (ERR) permettrait de déterminer les effets du thymol sur la croissance larvaire et des potentiels effets sur le métabolisme qui peut être observé par la quantification de l'ATP, le glycogène,

acide aminé, des glucides impliqués dans le métabolisme et le cycle de l'acide citrique avec un GC/MS (Tennesen et *al.*, 2011).

Des variations de la vitellogénine peuvent influencer l'immunité de l'abeille chez les adultes et une augmentation de son expression induit une immunosenescence par une diminution du nombre d'hémocytes (Amdam et *al.*, 2004, 2005). L'évaluation de l'effet du thymol sur l'immunité pourrait également être poursuivie grâce à une étude plus approfondie sur l'immunité cellulaire par la quantification du nombre d'hémocytes (Amdam et *al.*, 2005). L'intoxication d'ouvrières adultes au thymol a montré des variations d'expression du récepteur extracellulaire Dscam exprimé sur les hémocytes permettant la reconnaissance des pathogènes et de la map kinase Basket de la voie de signalisation de JNK impliquée dans le mécanisme d'apoptose et de l'activation de la mélanisation (Boncristiani et *al.*, 2012). Il serait intéressant de mesurer les variations d'expression de Dscam et Basket après une intoxication des larves au thymol. En revanche, l'expression de gènes effecteurs de l'immunité tels que le lysozyme et la phénol oxydase est moins évidente à valider d'autant plus que les données statistiques sont non linéarisables pour ces deux gènes. L'avènement récent des techniques transcriptomiques de nouvelle génération pourrait présenter une bonne alternative pour pallier ces limites. Ainsi, il est possible de scanner le scénario transcriptomique aux stades les plus significatifs (ici jour 6 et 8) exposés aux concentrations les plus significatives. L'utilisation de techniques de séquençage haut débit (RNAseq par exemple) ayant l'avantage de cibler les transcrits sans a priori pourrait en effet mettre en évidence les expressions différentielles des gènes impliqués dans l'immunité et le développement, mais aussi prospecter les variations d'autres gènes comme ceux des systèmes de détoxification suite aux différentes expositions au thymol. Les gènes exprimant des récepteurs neurotoxiques suspectés d'être à l'origine des changements comportementaux après exposition au thymol pourraient par la même occasion être identifiés.

ABRÉVIATIONS

AChE : AcétylCholine Estérase	HQ : Hazard Quotient
AESA : Autorité Européenne pour la Sécurité des Aliments	5-HT : 5-HydroxyTryptamine
AgriMer : Établissement national des produits de l'Agriculture et de la Mer	IAPV : Israeli Acute Paralysis Virus
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	ICPBR : Internationale des Relations Plantes-Abeille
AMV-RT : Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase	IGR : Insect Growth Regulator
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire	ITSAP : Institut Technique et Scientifique de l'Apiculture et de la Pollinisation
ATP : Adénosin TriPhosphate	L-DOPA : L- 3,4-DihydroxyPhénylAlanine
BP : Brood Pheromone	LB : Luria Bertani
CCD : Colony Collapse Disorder	LDH : Lactate DésHydrogénase
CCT : Caissons d'élevage Contaminés avec du Thymol	LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level
CDNB : 1-Chloro-2,4-DiNitroBenzene	LS : Larvae spinning
CEB : Commission des Essais Biologiques	MBC : Methyl Benzethonium Chloride (MBC)
CL 50 : Concentration Létale 50%	NOAEL : NO Observed Adverse Effect Level
CNCT : Caissons Non-Contaminés au Thymol	ODA : 9-Oxo-(E)-2-Decenoic Acid
DA : DopAmine	OGM : Organisme Génétiquement Modifié
DDT : DichloroDiphénylTrichloroethane	MBC : Methyl Benzethonium Chloride (MBC)
DL50 : Dose Létale 50%	PAC : Politique Agricole Commune
DMA : 2,4-DiMethylAniline	PBS : Phosphate Buffered Saline
DWV : Deformed Wing Virus	PCR Marker : Polymerase Chain Reaction Marker
ECOD : 7-EthoxyCoumarin O-Deethylase	QR : Quinone Réductase
FAO : Food and Agriculture Organization	QRP : Queen Retinue Pheromone
GABA : Acide γ -AminoButyrique	RFID : Radio Frequency IDentification
GLM : Generalized Linear Model	TRP : Transient Receptor Potential
GLMM : Generalized Linear Mixed Model	VEA : Valeur Économique Agricole
GST : Glutathion S Transférase	VEIP : Valeur Économique des Insectes Pollinisateurs

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Herrera, A., 2005. Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-*Varroa* treatments. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, 10085–90.
- A.F.S.S.A. 2005. Enquête prospective multifactorielle : influence des agents microbiens et parasites, et des résidus de pesticides sur le devenir de colonies d'abeilles domestiques en conditions naturelles. Available online : www.anses.fr/Document/SANT-Ra-Enquete-Abeilles2005.pdf
- Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., Aizen, M.A., 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology letters* 9, 968–80.
- Ahmad, A., Khan, A., Yousuf, S., Khan, L.A., Manzoor, N., 2010. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. *Fitoterapia* 81, 1157–62.
- Aizen, M.A., Harder, L.D., 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology* : CB 19, 915–8.
- Akhtar, Y., Isman, M.B., 2004. Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species. *Journal of Applied Entomology* 128, 32–38.
- Alaux, C., Le Conte, Y., Adams, H.A., Rodriguez-Zas, S., Grozinger, C.M., Sinha, S., Robinson, G.E., 2009. Regulation of brain gene expression in honey bees by brood pheromone. *Genes, brain, and behavior* 8, 309–19.
- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y., 2011. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *Varroa*-parasitized bees. *BMC genomics* 12, 496.
- Alberti, G., Hänel, H., 1986. Fine structure of the genital system in the bee parasite *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation. *Experimental & applied acarology* 2, 63–104.
- Alford, S., Grillner, S., 1991. The involvement of GABAB receptors and coupled G-proteins in spinal GABAergic presynaptic inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11, 3718–26.
- Aliouane, Y., El Hassani, A.K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., Gauthier, M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental toxicology and chemistry* 28, 113–22.
- Allen, M., Ball, B., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77, 141 – 162.
- Amandi, R., Hyde, J.R., Ross, S.K., Lotz, T.J., Poliakoff, M., 2005. Continuous reactions in supercritical fluids; a cleaner, more selective synthesis of thymol in supercritical CO₂. *Green Chemistry* 7, 288–293.

- Ambrose, A.M., Haag, H.B., 1938. Toxicological Studies of Derris Chronic Toxicity of Derris. *Industrial & Engineering Chemistry* 30, 592–595.
- Amdam, G. V, Aase, A.L.T.O., Seehuus, S.-C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., Hartfelder, K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental gerontology* 40, 939–47.
- Amdam, G. V, Norberg, K., Page, R.E., Erber, J., Scheiner, R., 2006. Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural brain research* 169, 201–5.
- Asencot, M., Lensky, Y., 1988. The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochemistry* 18, 127–133.
- Ashman, T.-L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T., Wilson, W.G., 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85, 2408–2421.
- Atkins, E.L., Kellum, D., 1986. Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* 25, 242–255.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific reports* 2, 326–333.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud B, Odoux, J., Pham-Delègue, M., 2005. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology* 58, 107 – 111.
- Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J.-N., Odoux, J.-F., 2007. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest management science* 63, 1090–4.
- Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Medrzycki, P., Padovani, E., Przygoda, D., Maus, C., Charriere, J.-D., Kilchenmann, V., Riessberger-Galle, U., Vollmann, J.J., Jeker, L., Janke, M., Odoux, J.-F., Tasei, J.-N., 2009. Honey bee brood ring-test: method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Julius-Kühn-Archiv* 96–102.
- Azirak, S., Rencuzogullari, E., 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental toxicology* 23, 728–35.
- Badiou, A., Belzunces, L.P., 2008. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. *Chemico-biological interactions* 175, 406–9.
- Badiou-Bénéteau, A., Carvalho, S.M., Brunet, J.-L., Carvalho, G.A., Buleté, A., Giroud, B., Belzunces, L.P., 2012. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and environmental safety* 82, 22–31.

- Bailey, L., 1961. European foulbrood. *American Bee Journal* 101, 89–92.
- Barbara, G.S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M., Grünewald, B., 2005. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* 191, 823–36.
- Barron, A.B., Søvnik, E., Cornish, J.L., 2010. The roles of dopamine and related compounds in reward-seeking behavior across animal phyla. *Frontiers in behavioral neuroscience* 4, 163.
- Belzunces, L.P., Vandame, R., Gu, X., 1996. Modulation of honey bee thermoregulation by adrenergic compounds. *Neuroreport* 7, 1601–4.
- Bergougnot, M., Treilhou, M., Armengaud, C., 2012. Exposure to thymol decreased phototactic behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*) in laboratory conditions. *Apidologie* 44, 82–89.
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (New York, N.Y.) 313, 351–4.
- Bogdanov, S., 2005. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1–18.
- Bogdanov, S., Imdorf, A., Kilchenmann, V., 1998. Residues in wax and honey after Apilife VAR[®] treatment. *Apidologie* 29, 513–524.
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A., 1999. Acaricide residues in honey, beeswax and propolis. *Swiss Bee Research Centre*.
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L., 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* 35, S4–S17.
- Bommarco, R., Biesmeijer, J.C., Meyer, B., Potts, S.G., Pöyry, J., Roberts, S.P.M., Steffan-Dewenter, I., Ockinger, E., 2010. Dispersal capacity and diet breadth modify the response of wild bees to habitat loss. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 277, 2075–82.
- Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., vanEngelsdorp, D., 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of insect physiology* 58, 613–20.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–54.
- Brockmann, A., Dietz, D., Spaethe, J., Tautz, J., 2006. Beyond 9-ODA: sex pheromone communication in the European honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of chemical ecology* 32, 657–67.
- Brodschneider, R., Crailsheim, K., 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41, 278–294.
- Brodschneider, R., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K., 2009. Flight performance of artificially reared honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 40, 441–449.

- Brouwers, E.V.M., Ebert R., Beetsma J, 1987. Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *Journal of Apicultural Research* 26, 11–23.
- Brown, M.J.F., Baer, B., 2005. The evolutionary significance of long copulation duration in bumble bees. *Apidologie* 36, 157–167.
- Brown, M.J.F., Paxton, R.J., 2009. The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie* 40, 410–416.
- Buchon, N., Broderick, N.A., Chakrabarti, S., Lemaitre, B., 2009. Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes & development* 23, 2333–44.
- Buckingham, S.D., Biggin, P.C., Sattelle, B.M., Brown, L.A., Sattelle, D.B., 2005. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Molecular pharmacology* 68, 942–51.
- Buyukleyla, M., Rencuzogullari, E., 2009. The effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and environmental safety* 72, 943–7.
- Casida, J.E., 2009. Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chemical research in toxicology* 22, 609–19.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annual review of entomology* 43, 1–16.
- Charrière, J.D., Imdorf, A., Bachoffen, B., 1998. Essai comparatif de cinq diffuseurs à acide formique. Centre Suisse de Recherches Apicoles, Liebefeld, 1-6.
- Charrière, J., Imdorf, A., 2002. Agroscope - Oxalic acid treatment by trickling against *Varroa destructor*: recommendations for use in central Europe and under temperate climate conditions. *Bee World* 83, 51–60.
- Chen, A.C., He, H., Davey, R.B., 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary parasitology* 148, 379–83.
- Chen, Y.P., Higgins, J.A., Feldlaufer, M.F., 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and environmental microbiology* 71, 436–41.
- Clément, H., 2002. Guide des miels. Paris : Rustica.
- Colin, M.E., Ducos de Lahitte, J., Larribau, E., Boué, T., 1989. Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascophaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 20, 221–228.
- Colin, M.E., Vandame, R., Jourdam, P., Di Pasquale, S., 1997. Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie* 28, 375–384.

COLOSS, 2010. Workshop “Method standardization for larval tests”.

<http://www.coloss.org/publications/ProceedingsCOLOSSLarvalRearingGraz2010.pdf>. [accessed May].

COLOSS, 2011. WG 3 Workshop “In vitro larval rearing workshop”.

<http://www.coloss.org/publications/la-rochelle-france-18-19-november-2011-in-vitro-larval-rearing-workshop>. [accessed November].

Crane, E., 1990. Bees and beekeeping: Science, Practice and world resources. Oxford : Heinemann, 614 p.

Costa, C., Lodesani, M., Maistrello, L., 2009. 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.

Cox-Foster, D.L., Schonbaum, C.P., Murtha, M.T., Cavener, D.R., 1990. Developmental expression of the glucose deshydrogénase gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 124, 873–80.

Crailsheim, K., Brodschneider, R., Aupinel, P., Behrens, D., Genersch, E., Vollmann, J., Riessberger-Gallé, U., 2013. Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae - International Bee Research Association. *Journal of Apicultural Research* 52, 10.3896/IBRA.1.52.1.05.

Daemon, E., De Oliveira Monteiro, C.M., Dos Santos Rosa, L., Aparecido Clemente, M., Arcoverde, A., 2009. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology research* 105, 495–7.

Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., Hultmark, D., 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular & general genetics* 242, 152–62.

Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and environmental microbiology* 78, 981–7.

Damiani, N., Gende, L.B., Bailac, P., Marcangeli, J.A., Eguaras, M.J., 2009. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitology research* 106, 145–52.

Davis, A.R., Solomon, K.R., Shuelr. W., 1988. Laboratory studies of honeybee larval growth and development as affected by systemic insecticides at adult-sublethal levels. *Journal of Apicultural Research* 27, 146-161.

Decker, H., Jaenicke, E., 2004. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and comparative immunology* 28, 673–87.

Decourtye, A., Henry, M., Desneux, N., 2013. Environment: Overhaul pesticide testing on bees. *Nature* 497, doi:10.1038/497188a.

Decourtye, A., Mader, E., Desneux, N., 2010. Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41, 264–277.

- Deseyn, J., Billen, J., 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36, 49–57.
- Donzé, G., 1995. Adaptations comportementales de l'acarien ectoparasite *Varroa jacobsoni* durant sa phase de reproduction dans les alvéoles operculées de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. Thèse de doctorat ès sciences, Université de Neuchâtel, 152 p.
- Doull, K.M., 1976. The effects of different humidities on the hatching of the eggs of honeybees. *Apidologie* 7, 61–66.
- Dujin, T., Jovanovic, V., Suvakov, D., Milkovic, Z., 1991. Effects of extended utilisation of amitraz-based preparations on the formation of resistant strains of *Varroa jacobsoni*. *Vet Glas* 45, 851–855.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzchmar, A., Le Conte, Y., 2013. 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.
- E.F.S.A. 2012. Panel on plant protection products and their residues (PRP) ; Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. And solitary bees. EFSA journal 10(5) 2668. [275 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2668. Available online: [www/efsa.europa](http://www.efsa.europa).
- Eilers, E.J., Kremen, C., Smith Greenleaf, S., Garber, A.K., Klein, A.-M., 2011. Contribution of pollinator-mediated crops to nutrients in the human food supply. *PloS one* 6, e21363.
- Ellis, J.D., Munn, P.A., 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86, 88 – 101.
- Emsen, B., Dodoglu, A., 2009. The Effects of Using Different Organic Compounds against Honey Bee Mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) on Colony Developments of Honey Bee (*Apis mellifera* L.) and Residue Levels in Honey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 1004–1009.
- Enan, E.E., 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect biochemistry and molecular biology* 35, 309–21.
- Evans, J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of invertebrate pathology* 85, 105–11.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* 15, 645–56.
- Evans, J.D., Boncristiani Jr., H., Chen, Y., 2010. Scientific note on mass collection and hatching of honey bee embryos. *Apidologie* 41, 654–656.
- Evans, P.D., Gee, J.D., 1980. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature* 287, 60–2.

- Fahrenholz, L., Lamprecht, I., Schrick, B., 1989. Thermal investigations of a honey bee colony: thermoregulation of the hive during summer and winter and heat production of members of different bee castes. *Journal of Comparative Physiology B* 159, 551–560.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C., 2011. Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 101, 78–87.
- Faucon, J.-P., Aurières, C., Drajnudel, P., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A.-C., Zeggane, S., Chauzat, M.-P., Aubert, M.F.A., 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest management science* 61, 111–25.
- Faucon JP., Drajnudel P., Chauzat M.P., Aubert M., 2007. Contrôle de l'efficacité du médicament APIVAR ND contre *Varroa destructor*, parasite de l'abeille domestique. *Revue Médecine Vétérinaire* 158, 283-290.
- Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A., 2004. Comparison Between Two Thymol Formulations in the Control of *Varroa destructor*: Effectiveness, Persistence, and Residues. *Journal of Economic Entomology* 97, 187–191.
- Fluri, P., 1994. Réflexions des chercheurs en apiculture sur la régulation de la durée de vie des ouvrières. *Journal suisse d'Apiculture*, 91, 19-27.
- Foley, K., Fazio, G., Jensen, A.B., Hughes, W.O.H., 2012. Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *Journal of invertebrate pathology* 111, 68–73.
- Fox, J., 2002. Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data.
<http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-cox-regression.pdf> [accessed February].
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K., 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *The Journal of biological chemistry* 265, 11333–7.
- Frazier, M., 2009. Objective 1.8: Determine sublethal effects of pesticides on bees exposed to pesticides and selected combinations of pesticides during larval development and the nurse bee stage. Managed Pollinator CAP: University of Georgia.
<http://www.beccdcap.uga.edu/objectives/obj18.html> (accessed January 27, 2010).
- Fuselli, S.R., García De La Rosa, S.B., Gende, L.B., Eguaras, M.J., Fritz, R., 2006. Inhibition of *Paenibacillus* larvae employing a mixture of essential oils and thymol. *Revista Argentina de microbiología* 38, 89–92.
- 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.

- Gashout, H.A., Guzmán-Novoa, E., 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* 48, 263–269.
- Gershenzon, J., Croteau, R., 1990. Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 24, 99–160.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology* 42, 611–43.
- Giray, T., Robinson, G.E., 1994. Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 35, 13–20.
- Giurfa, M., 1993. The repellent scent-mark of the honeybee *Apis mellifera* tigustica and its role as communication cue during foraging. *Insectes Sociaux* 40, 59–67.
- Giurfa, M., Sandoz, J.-C., 2012. Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory* 19, 54–66.
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142, 1–16.
- Gould, J.L., Gould, C.G., 1993. Les abeilles, comportement, communication et capacités sensorielles. In *Pour la science*, Paris, 239 p.
- Graaf, D.C., Vandekerchove, D., Dobbelaere, W., Peeters, J.E., Jacobs, F.J., 2001. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus* larvae spores in Belgian honey. *Apidologie* 32, 587–599.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *Journal of insect physiology* 58, 1042–9.
- Gregorc, A., Pogacnik, A., Bowen, I.D., 2004. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35, 453–460.
- Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G. V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L.P., Hartfelder, K., 2005a. Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS letters* 579, 4961–5.
- Guidugli, K.R., Piulachs, M.-D., Bellés, X., Lourenço, A.P., Simões, Z.L.P., 2005b. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of insect biochemistry and physiology* 59, 211–218.
- Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B., Glenn, T., 2002. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *Journal of economic entomology* 95, 28–35.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry* 249, 7130–7139.

- Halm, M.-P., Rortais, A., Arnold, G., Taséi, J.N., Rault, S., 2006. New Risk Assessment Approach for Systemic Insecticides: The Case of Honey Bees and Imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science & Technology* 40, 2448–2454.
- Hardstone, M.C., Scott, J.G., 2010. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest management science* 66, 1171–80.
- Harpur, B.A., Minaei, S., Kent, C.F., Zayed, A., 2012. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture. *Molecular ecology* 21, 4414–21.
- Hartfelder, K., Rembold, H., 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *Journal of Comparative Physiology B* 160, 617–620.
- Hendriksma, H.P., Härtel, S., Steffan-Dewenter, I., 2011. Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods in Ecology and Evolution* 2, 509–517.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., Decourtye, A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336, 348–50.
- 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., Martín, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology* 92, 93–5.
- Hoffmann, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33–8.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *The Science of the total environment* 408, 3746–62.
- Hong, J.-Y., Jung, O.-S., Ryoo, J.-J., Hong, J.-K., 2009. Determination of Acaricides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography / Mass Spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 30, 61–66.
- Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., Tholl, D., 2010. Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant physiology* 153, 1293–310.
- Huang, Z.-Y., 1990. A simple *in vivo* estimation of hypopharyngeal gland activity in honeybees (*Apis mellifera* L., Apidae, Hymenoptera). *Journal of Apicultural Research* 29, 75–81.
- Huang, Z.-Y., Otis, G.W., 1991. Inspection and feeding of larvae by worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): Effect of starvation and food quantity. *Journal of Insect Behavior* 4, 305–317.

- Hultmark, D., 1996. Insect lysozymes. *EXS* 75, 87–102.
- Hummelbrunner, L., Isman, L., 2001. Acute, Sublethal, Antifeedant and Synergistic Effects of Monoterpenoid Essential Oil Compounds on the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: noctuidae). *Journal agricultural food chemistry* 49, 715–720.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Maquelin, C., 1995. Apilife Var: A new *Varroa* acaricide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76, 77–83.
- Imdorf, A., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Bachofen, B., Beretta, C., 1996a. Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L im Labortest. Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera* L in a laboratory test. *Apidologie* 26, 27 – 31.
- Imdorf, A., Rickli, M., Fluri, P., 1996b. Dynamique des populations d'abeilles. *FAM Publikation Sektion Bienen* 1-48.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V., 1999. Acaricide residues in honey, beeswax and propolis. Swiss bee research centre.
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Berger, T., 2006. The acaricidal effects of essential oils from thyme, salvia and hyssop plants (from left to right) have been tested against *Varroa destructor*. *ALP Science* 495, 3–18.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1987. Overall evaluations of carcinogenicity : an updating of IARC monographs volumes 1-42. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7, Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19, 603–608.
- Jay, S.C., 1962. Colour changes in honeybee nymphs. *Bee World* 43, 119–122.
- Jay, S.C., 1964. The Cocoon of the Honey Bee, *Apis mellifera* L. *The Canadian Entomologist* 96, 784–792.
- Johnson, B.R., 2010. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral ecology and sociobiology* 64, 305–316.
- Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PloS one* 8, e54092.
- Kanbar, G., Engels, W., Nicholson, G.J., Hertle, R., Winkelmann, G., 2004. Tyramine functions as a toxin in honey bee larvae during *Varroa* -transmitted infection by *Melissococcus pluton*. *FEMS Microbiology Letters* 234, 149–154.
- Kanost, M.R., Dai, W., Dunn, P.E., 2005. Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 8, 147–164.

- Karpouhtsis, I., Pardali, E., Feggou, E., Kokkini, S., Scouras, Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1111–1115.
- Kilani, M., Bussieras, J., Popa, A., Sakli, A., 1981. Essai préliminaire de traitement de la *Varroase* (*Varroa jacobsoni*) de l'abeille domestique par l'amitraz. *Apidologie* 12, 31–36.
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tschamntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings Biological sciences* 274, 303–13.
- Kohlert, C., Schindler, G., März, R.W., Abel, G., Brinkhaus, B., Derendorf, H., Gräfe, E.-U., Veit, M., 2002. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *Journal of clinical pharmacology* 42, 731–7.
- Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology* 91, 453–62.
- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B., 1990. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften* 77, 334–336.
- Le Conte, Y., Bécard, J.-M., Costagliola, G., De Vaublanc, G., El Maâtaoui, M., Crauser, D., Plettner, E., Slessor, K.N., 2006. Larval salivary glands are a source of primer and releaser pheromone in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften* 93, 237–41.
- Le Conte, Y., Mohammadi, A., Robinson, G.E., 2001. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proceedings Biological sciences* 268, 163–8.
- Le Conte, Y., Sreng, L., Poitout, S.H., 1995. Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology* 88, 798–804.
- Le Conte, Y., Sreng, L., Trouiller, J., 1994. The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften* 81, 462–465.
- Le Conte Y., 2002. La vie sociale de la colonie. In *Le traité rustica de l'apiculture*. Paris : Rustica p. 54-83.
- Lee, W.-R., Kim, S.-J., Park, J.-H., Kim, K.-H., Chang, Y.-C., Park, Y.-Y., Lee, K.-G., Han, S.-M., Yeo, J.-H., Pak, S.C., Park, K.-K., 2010. Bee venom reduces atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory mechanism. *The American journal of Chinese medicine* 38, 1077–92.
- Lei, J., Leser, M., Enan, E., 2010. Nematicidal activity of two monoterpenoids and SER-2 tyramine receptor of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical pharmacology* 79, 1062–71.
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., De Miranda, J.R., 2012. Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control. *Applied and environmental microbiology* 78, 227–35.
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R., Sabatini, A.G., 2008. Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie* 39, 324–333.

- Loucif-ayad, W., Aribi, N., Soltani, N., 2008. Evaluation of Secondary Effects of some acaricides on *Apis mellifera* Intermissa (Hymenoptera, Apidae): Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activities. *European Journal of Scientific Research* 21, 642–649.
- Lourenço, A.P., Mackert, A., Dos Santos Cristino, A., Simões, Z.L.P., 2008. Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie* 39, 372–385.
- Lovallo, N., Cox-Foster, D.L., 1999. Alteration in FAD-glucose deshydrogénase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *Journal of insect physiology* 45, 1037–1048.
- Lucchini, J., Corre, J., Cremieux, A., 1990. Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. *Research in Microbiology* 141, 499–510.
- Lummis, S.C.R., 1990. GABA receptors in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology* 95, 1–8.
- Maisonnasse, A., Lenoir, J.-C., Beslay, D., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. E- β -ocimene, a volatile brood pheromone involved in social regulation in the honey bee colony (*Apis mellifera*). *PloS one* 5, e13531.
- Maistrello, L., Lodesani, M., Costa, C., Leonardi, F., Marani, G., Caldon, M., Mutinelli, F., Granato, A., 2008. Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39, 436–445.
- Martin, C., Salvy, M., Provost, E., Bagneres, A.-G., Roux, M., Crauser, D., Clement, J.-L., Le Conte, Y., 2001. Variations in chemical mimicry by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* according to the developmental stage of the host honey-bee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 15.
- Mattila, H.R., Otis, G.W., Daley, J., Schulz, T., 2000. Trials of apiguard, a thymol-based miticide part 2. Non-target effects on honey bees. *American Bee Journal* 140, 68–70.
- Mattila, H.R., Seeley, T.D., 2007. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* (New York, N.Y.) 317, 362–4.
- Merkx-Jacques, M., Bede, J.C., 2005. Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *Journal of insect science* (Online) 5, 48.
- Michelsen, A., 1993. The transfer of information in the dance language of honeybees: progress and problems. *Journal of Comparative Physiology A* 173.
- Michener, C.D., 2007. The bees of the world. John Hopkins Univ. Press, Baltimore, Maryland, USA, 913.
- Michiels, J., Missotten, J., Van Hoorick, A., Ovyne, A., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N., 2010. Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Archives of animal nutrition* 64, 136–54.

- Miguel, I., Iriondo, M., Garnery, L., Sheppard, W.S., Esteban, A., 2007. Gene flow within the M evolutionary lineage of *Apis mellifera*: role of the Pyrenees, isolation by distance and post-glacial re-colonization routes in the western Europe. *Apidologie* 38, 141–155.
- Milani, N., 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30, 229–234.
- Mohammed, A., Paris, A., Crauser, D., Le Conte, Y., 1998. Effect of Aliphatic Esters on Ovary Development of Queenless Bees (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften* 85, 455–458.
- Monastirioti, M., Linn, C.E., White, K., 1996. Characterization of Drosophila tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 3900–11.
- Münch, D., Kreibich, C.D., Amdam, G. V., 2013. Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *The Journal of experimental biology* 216, 1638–49.
- Mustard, J.A., Kurshan, P.T., Hamilton, I.S., Blenau, W., Mercer, A.R., 2005. Developmental expression of a tyramine receptor gene in the brain of the honey bee, *Apis mellifera*. *The Journal of comparative neurology* 483, 66–75.
- Nässel, D.R., 1999. Histamine in the brain of insects: a review. *Microscopy research and technique* 44, 121–36.
- 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.
- Neukirch, A., 1982. Dependence of the life span of the honeybee (*Apis mellifica*) upon flight performance and energy consumption. *Journal of Comparative Physiology* 146, 35–40.
- Newton, K., Peters, R., Raftos, D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Developmental and comparative immunology* 28, 565–9.
- Nieh, J.C., 2010. A negative feedback signal that is triggered by peril curbs honey bee recruitment. *Current biology* 20, 310–5.
- Niu, G., Johnson, R.M., Berenbaum, M.R., 2010. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie* 42, 79–87.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., González, M.J., Higes, M., 2002. Extraction of thymol, eucalyptol, menthol, and camphor residues from honey and beeswax. Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of chromatography. A* 954, 207–15.
- Oldroyd, B.P., Smolenski, A.J., Cornuet, J.-M., Wongsiri, S., Estoup, A., Rinderer, T.E., Crozier, R.H., 1995. Levels of polyandry and intracolony genetic relationships in *Apis florea*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 37, 329–335.
- Orantes-Bermejo, F.J., Gómez Pajuelo, A., Megías Megías, M., Torres Fernández-Piñar, C., 2010. Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses - *International Bee Research Association. Journal of Apicultural Research* 48, 243–250.

- Osano, O., Oladimeji, A.A., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., 2002. Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. *Archives of environmental contamination and toxicology* 43, 42–9.
- Ozvegy, C., Litman, T., Szakács, G., Nagy, Z., Bates, S., Váradi, A., Sarkadi, B., 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 111–7.
- Page, R.E., Peng, C.Y.-S., 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36, 695–711.
- Pandey, S.K., Upadhyay, S., Tripathi, A.K., 2009. Insecticidal and repellent activities of thymol from the essential oil of *Trachyspermum ammi* (Linn) Sprague seeds against *Anopheles stephensi*. *Parasitology research* 105, 507–12.
- Pankiw, T., 2004. Cued in: honey bee pheromones as information flow and collective decision-making. *Apidologie* 35, 217–226.
- Parnas, M., Peters, M., Dadon, D., Lev, S., Vertkin, I., Slutsky, I., Minke, B., 2009. Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell calcium* 45, 300–9.
- Passreiter, C.M., Wilson, J., Andersen, R., Isman, M.B., 2004. Metabolism of thymol and trans-anethole in larvae of *Spodoptera litura* and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 2549–51.
- Peng, Y.S.C., Mussen, E., Fong, A., Montague, M.A., Tyler, T., 1992. Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared *in vitro*. *Journal of invertebrate pathology* 60, 127–133.
- Pettis, J.S., van Engelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–8.
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., Sattelle, D.B., 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homooligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British journal of pharmacology* 140, 1363–72.
- Prisco, G. Di, Zhang, X., Pennacchio, F., Caprio, E., Li, J., Evans, J.D., Degrandi-Hoffman, G., Hamilton, M., Chen, Y.P., 2011. Dynamics of persistent and acute deformed wing virus infections in honey bees, *Apis mellifera*. *Viruses* 3, 2425–41.
- Rachinsky, A., Strambi, C., Strambi, A., Hartfelder, K., 1990. Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* 79, 31–38.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., Nitsche, A., 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313, 856–862.
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M.J., Albert, S., Tautz, J., Beier, H., 2008. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury

- differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of insect biochemistry and physiology* 69, 155–67.
- Rasmont, P., Ebmer, P.A., Banaszak, J., van Der Zanden, G., 1995. Hymenoptera Apoidea Gallica. Liste taxonomique des abeilles de France, de Belgique, de Suisse et du Grand-Duché de Luxembourg. *Bulletin de Société Entomologique de France*, 100, 1-98.
- Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* 29, 913–920.
- Rembold, H., Kremer, J.-P., Ulrich, G.M., 1980. Characterization of postembryonic developmental stages of the female castes of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 11, 29–38.
- Rennich, K., Pettis, J., van Engelsdorp, D., Bozarth, R., Eversole, H., Roccasecca, K., Smith, M., Stitsinger, J., Andree, M., Snyder, R., Rice, N., Evans, J., Levi, V., Lopez, D., Rose, R., 2011-2012. National Honey Bee Disease & Pest Survey Report. http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2011_National_Survey_Report.pdf [accessed March 2012].
- Ricketts, T.H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Bogdanski, A., Gemmill-Herren, B., Greenleaf, S.S., Klein, A.M., Mayfield, M.M., Morandin, L.A., Ochieng', A., Potts, S.G., Viana, B.F., 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology letters* 11, 499–515.
- Rickli, M., Imdorf, A., Kilchenmann, V., 1991. *Varroa*-Bekämpfung mit Komponenten von ätherischen Ölen Treatment against *Varroa*osis using compounds of essential oils. *Apidologie* 22, 417 – 421.
- Rinderer, T.E., De Guzman, L.I., Delatte, G.T., Stelzer, J.A., Lancaster, V.A., Kuznetsov, V., Beaman, L., Watts, R., Harris, J.W., 2001. Resistance to the parasitic mite *Varroa destructor* in honey bees from far-eastern Russia. *Apidologie* 32, 381–394.
- Robinson, G.E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annual review of entomology* 37, 637–65.
- Robinson, G.E., Page, R.E., Strambi, C., Strambi, A., 1989. Hormonal and genetic control of behavioral integration in honey bee colonies. *Science* (New York, N.Y.) 246, 109–12.
- Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36, 71–83.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology* 103, 96–119.
- Rosenzweig, M., Kang, K., Garrity, P.A., 2008. Distinct TRP channels are required for warm and cool avoidance in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14668–73.

- Ruttner, F., 1988 Biogeography and taxonomy of the honeybee. Springer Verlag Eds, Berlin Heidelberg : 284 p.
- Sangkyun, L., Tsao, R., Coats, J.R., 1999. Influence of dietary applied monoterpenoids and derivatives on survival and growth of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of economic entomology* 92, 56–67.
- Sammataro, D., Avitabile, A., 1998. The Beekeeper's Handbook. Ithaca, New York : Cornell University Press
- Saraswati, S., Fox, L.E., Soll, D.R., Wu, C.-F., 2004. Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. *Journal of neurobiology* 58, 425–41.
- Sasaki, K., Wada, K., Tanaka, Y., Yoshimura, T., Matuoka, K., Anno, T., 2005. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. *Journal of medicinal food* 8, 184–9.
- Sauerwald, N., Polster, J., Bengsch, E., Niessen, L., Vogel, R.F., 1998. Combined antibacterial and antifungal properties of water soluble fractions of Royal Jelly. *Advances in food sciences* 20, 46–52.
- Schmid-Hempel, P., Crozier, R.H., 1999. Ployandry versus polygyny versus parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 354, 507–515.
- Schulz, D.J., Huang, Z.-Y., Robinson, G.E., 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42, 295–303.
- Selcho, M., Pauls, D., El Jundi, B., Stocker, R.F., Thum, A.S., 2012. The Role of octopamine and tyramine in *Drosophila* larval locomotion. *The Journal of comparative neurology* 520, 3764–85.
- Si, A., Zhang, S.-W., Maleszka, R., 2005. Effects of caffeine on olfactory and visual learning in the honey bee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 82, 664–72.
- Singh, V.K., Singh, S., Singh, D.K., 1999. Effect of active molluscicidal component of spices on different enzyme activities and biogenic amine. *Phytotherapy research : PTR* 13, 649–54.
- Sing-Yi Feng, M., Collin Goto, M., 2008. Hymenoptera Envenomation Bees, Wasps, And Ants. *Pediatric Emergency Medicine Practice* 5, 1–20.
- Slessor, K.N., Winston, M.L., Le Conte, Y., 2005. Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of chemical ecology* 31, 2731–45.
- Smedal, B., Brynem, M., Kreibich, C.D., Amdam, G. V., 2009. Brood pheromone suppresses physiology of extreme longevity in honeybees (*Apis mellifera*). *The Journal of experimental biology* 212, 3795–801.
- Smodis Skerl, M.I., Kmecl, V., Gregorc, A., 2010. Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 85, 125–8.

- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry* 20, 2482–6.
- Tautz, J., 2008. The buzz about bees: Biology of a superorganism. Berlin: SpringerVerlag.
- Tomlin, B., 2006. On the Value of Mitigation and Contingency Strategies for Managing Supply Chain Disruption Risks. *Management Science* 52, 639–657.
- Torfs, H., Van Poyer, W., Poels, J., Swinnen, E., De Loof, A., Vanden Broeck, J., 2000. Tyramine injections reduce locust viability. *Acta biologica Hungarica* 51, 349–54.
- Vandame, R., 1996. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acarien parasite *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* européenne et africanisée, en climat tropical humide du Mexique. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon 1, 126 p.
- Vandame, J., 2010. Lutte contre *Varroa*. Efficacité des médicaments AMM. La santé de l'abeille, 237.
- Vandenberg, J.D., Shimanuki, H., 1987. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *Journal of apicultural research* 26, 90–97.
- Van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one* 4, e6481.
- Van Engelsdorp, 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, 80–95.
- Vidal-Naquet, N., 2009. Les médicaments vétérinaires pour les abeilles: Situation en Europe. Apivet. [en-ligne]. [http://www.apivet.eu/abeilles_dailleurs/] (consultée le 12 octobre 2011).
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vigùès, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PloS one* 6, e21550.
- Vojvodic, S., Jensen, A.B., Markussen, B., Eilenberg, J., Boomsma, J.J., 2011. Genetic variation in virulence among chalkbrood strains infecting honeybees. *PloS one* 6, e25035.
- Wager, B.R., Breed, M.D., 2000. Does Honey Bee Sting Alarm Pheromone Give Orientation Information to Defensive Bees? *Annals of the Entomological Society of America* 93, 1329–1332.
- Waliwitiya, R., Belton, P., Nicholson, R.A., Lowenberger, C.A., 2010. Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. *Pest management science* 66, 277–89.
- Waliwitiya, R., Isman, M.B., Vernon, R.S., Riseman, A., 2005. Insecticidal activity of selected monoterpenoids and rosemary oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *Journal of economic entomology* 98, 1560–5.

- Wallner, K., 1999. *Varroacides* and their residues in bee products. *Apidologie* 30, 235–248.
- Webster, T.C., Peng, Y.-S., 1988. The evolution of food-producing glands in eusocial bees (Apoidea, Hymenoptera)1. *Journal of Evolutionary Biology* 1, 165–176.
- Weiberg, K.P., Madel, G., 1985. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 16, 421–436.
- Winfree, R., Aguilar, R., Vázquez, D.P., LeBuhn, G., Aizen, M.A., 2009. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology* 90, 2068–2076.
- Winston, M.L., 1993. La biologie de l'abeille. Traduit de l'anglais par G. Lambermont. Edition Frison Roche, Paris.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one* 6, e14720.
- 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, 326–9.
- Xiao, B., Dubin, A.E., Bursulaya, B., Viswanath, V., Jegla, T.J., Patapoutian, A., 2008. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 9640–51.
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B.-P., Pei, R.-S., Xu, N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in applied microbiology* 47, 174–9.
- Xuan, N.T., Shumilina, E., Schmid, E., Bhavsar, S.K., Rexhepaj, R., Götz, F., Gulbins, E., Lang, F., 2010. Role of acidic sphingomyelinase in thymol-mediated dendritic cell death. *Molecular nutrition & food research* 54, 1833–41.
- Yang, X., Cox-Foster, D., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 134, 405–12.
- Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7470–5.
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., Genersch, E., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology* 10, 1612–20.
- Zou, Z., Lopez, D.L., Kanost, M.R., Evans, J.D., Jiang, H., 2006. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect molecular biology* 15, 603–14.

ANNEXES

Annexe 1

Annexe 1 : Coût de l'investissement et du consommable pour la détermination de la toxicité d'une cire sur le développement larvaire par une méthode d'élevage *in vitro*.

Coût pour la détermination de la toxicité d'une cire			
Nom	Volume vendu	Quantité	Prix (euros)
Matériel au laboratoire			
K ₂ SO ₄	140g	0,14	5,208
NaCl	400g	0,4	1,2
Coton dentaire	120	0,12	0,6
Plaques de culture cellulaire 48 puits	4	0,04	8
Pointes de pipette 10 -20 ml stérile	1	0,002	0,226
Seringues 10 ml	1	0,01	0,8
Filtres à seringues	1	0,02	0,72
Falcon [®] stériles	1	0,01	0,1
Extrait de levures	0,33g	0,004	0,192
Fructose	1g	0,004	0,26
Glucose	1g	0,004	0,088
Total pour le consommable de laboratoire			17,394
Matériel du rucher			
Cupules de greffage plastique Nicot [®]	120	0,12	2,64
Gelée royale	10	0,2	24
Pollen	50	0,05	0,75
Sirop	50	0,005	0,075
Total pour le consommable au rucher			27,465
Coût total initial			44,859

Annexe 2

Annexe 2 : Coût de l'investissement et du consommable pour la détermination de la toxicité d'une molécule sur le développement larvaire par une méthode d'élevage *in vitro*.

Investissement			
Nom	Quantité	Prix (euros)	Total
matériel au laboratoire			
Spectrophotomètre Tecan infinite M200®	1	50000	50000
Etuve Binder® ventilé de 750L	1	5000	5000
Dessiccateur en Plexiglass® (Nalgene®) 5 glissières	2	600	1200
Dessiccateur en Plexiglass® (Nalgene®) 7 glissières	2	800	1600
Loupe binoculaire	1	500	500
Lampe et loupe pour greffage	1	200	200
Micropipette Stepper® (VWR) 30-300µl	1	500	500
Thermomètre/hygromètre	4	40	160
Balance de haute précision	1	2000	2000
Total			61160
Matériel au rucher			
Cinq ruches + 5 essaims Buckfast	5	200	1000
Système cupularve	5	50	250
Cage à reine	5	50	250
Combinaison + gant	2	120	240
Enfumeur	1	30	30
Nourrisseur	2	15	30
Lève cadre	1	10	10
Total			1810
Coût pour la détermination de la toxicité d'une molécule			
Nom	Volume vendu	Quantité	Prix (euros)
Matériel au laboratoire			
Kit d'enzymologie		1000	1000
K ₂ SO ₄	140g	0,42	15,624
NaCl	400g	1,2	3,6
Coton dentaire	170	0,51	2,55
Plaque de culture cellulaire 48 puits	9	0,27	54
Pointes de pipette 10 -20 ml stérile	3	0,018	2,034
Seringue 10 ml	3	0,09	7,2
Filtre à seringue	3	0,18	6,48
Falcon® plastique stérile	2	0,06	0,6
Extrait de levures	1g	0,012	0,576
Fructose	4g	0,012	0,78
Glucose	4g	0,012	0,264
Total pour le consommable de laboratoire			1093,708
Matériel du rucher			
Cupules de greffage plastique Nicot®	800	2,4	52,8
Gelée royale	30	0,9	108
Pollen	50	0,15	2,25
Sirop	50	0,015	0,225
Total pour le consommable au rucher			163,275
Coût total initial			1256,983

Annexe 3



Research Article



Received: 6 September 2012

Revised: 6 March 2013

Accepted article published: 6 March 2013

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3539

Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared *in vitro*

Gael Charpentier,^a Cyril Vidau,^a Jean-Baptiste Ferdy,^b Jeremy Tabart^a and Angelique Vetillard^{a*}

Abstract

BACKGROUND: Thymol offers an attractive alternative to synthetic chemicals to keep *Varroa* under control. However, thymol accumulates in bee products and is suspected of having adverse effects on colonies and especially on larvae. In this study, we investigated the effects of acute and chronic exposure to thymol on larvae reared *in vitro* with contaminated food and compared results to the theoretical larval exposure based on the amount of pollen and honey consumed by larvae during their development.

RESULTS: The laboratory assays reveal that, first, the 48 h-LD₅₀ of thymol introduced into larval food is 0.044 mg larva⁻¹. Second, the 6 day-LC₅₀ is 700 mg kg⁻¹ food. A significant decrease of larval survival and mass occurred from 500 mg thymol kg⁻¹ food ($P < 0.0001$). Finally, vitellogenin expression, which reached a maximum at the fifth instar larvae, is delayed for individuals exposed to 50 mg thymol kg⁻¹ food ($P < 0.0006$). That is 10 times higher than the theoretical level of exposure.

CONCLUSION: Based on the level of thymol residue found in honey and pollen, these results suggest that the contamination of food by thymol represents no notable risk for the early-developing larvae.

© 2013 Society of Chemical Industry

Keywords: thymol; honeybee; toxicity; *in vitro* rearing; vitellogenin

1 INTRODUCTION

The parasitic mite *Varroa destructor* is undoubtedly the world's most devastating pest of the European honeybee, *Apis mellifera*.¹ *Varroa* is an acarid that parasitises honeybees at all stages by sucking haemolymph. Its most deleterious effects are seen in larvae and pupae² in which the infestation leads to weakened adults with morphological and behavioural deficits and a reduced lifespan.^{3,4} Due to these debilitating effects, the mite is considered to play an important role in the bee population decline^{5,6} and in the high rates of over-wintering mortality.^{4,7,8}

To control *Varroa* infestation, beekeepers employ a range of synthetic acaricides such as amitraz (formamidine), coumaphos (organophosphorus insecticide) or fluvalinate (pyrethroid). However, the consistent and exclusive use of these chemicals has led to the emergence of resistant mites¹ and to a decrease in the efficacy of these treatments.⁹ In addition, these chemicals accumulate in bee products (honey, wax, pollen)¹⁰ and have negative effects on bee health.^{1,11–13} Natural products constitute therefore an attractive alternative and are used increasingly. Amongst them, the neurotoxic acaricide thymol (5-methyl-2-isopropyl-1-phenol), available through three registered formulations (Apliguard®, Thymovar® and Aplife VAR®) and many homemade preparations, is used worldwide. Depending on the formulation, 15–40 g of thymol is introduced near the brood frames as powder or soaked strips. The treatment is performed at the beginning of the autumn after the honey harvest and during the peak of infestation. During that season, in the temperate regions of the world, the brood present in the hive produces winter bees that will ensure the survival of

the colony during winter and a resilient restart of the colony the following spring. So, it is crucial that the thymol treatment is safe, especially for larvae. Over the 2–3 weeks of treatment, both bees and mites are thus exposed to vapours of thymol and residues accumulate in bee products.¹⁴ Differences in residue levels found in the hive can be observed due to the treatment type, the number of repeats and the amount of time between the treatment ending and the sampling. Because of its lipophilic properties, thymol accumulates preferentially in wax, as observed by Bogdanov *et al.* (662–4753 mg kg⁻¹)¹⁴ and by Floris *et al.* (21.6–147.7 mg kg⁻¹).¹⁵ However, several studies showed that thymol can also accumulate in pollen (0.037–39.7 mg kg⁻¹)¹⁶ and honey, as seen by Bogdanov *et al.* (2.07–7.54 mg kg⁻¹),¹⁴ by Floris *et al.* (0.4–8.8 mg kg⁻¹),¹⁵ by Adamczyk *et al.* (0.75–8.2 mg kg⁻¹)¹⁷ and by Nozal *et al.* (0.62–2.65 mg kg⁻¹).¹⁸ Pollen and honey are the main compounds of larval food but the risk to larvae exposed to thymol is still speculative. However, a field study has revealed that thymol based-treatment (Apliguard®) affected the expression of genes involved in detoxification, immunity and development of adult bees to a greater extent than did fluvalinate.¹³ Furthermore,

* Correspondence to: Angelique Vetillard, Venom and Biological Activities Laboratory, EA 4357, PRES-université de Toulouse, Jean-François Champollion University Center, Albi, France. E-mail: angelique.vetillard@univ-jfc.fr

^a Venom and Biological Activities Laboratory, Jean-François Champollion University Center, EA, 4357, PRES-université de Toulouse Albi, France

^b Department of Evolution and Biological Diversity, University of Toulouse, France

and Guzmán-Novoa¹⁹ have shown in a study conducted *in vivo* that thyme oil was more toxic to larvae [lethal concentration 50 (LC₅₀), 0.150 mg larva⁻¹] than to adult bees (LC₅₀, 0.210 mg bee⁻¹). These data suggest that thymol could exhibit larvicidal activity after treatment, which could explain the brood removal reported in some studies.^{20,21} The most important phase of larval development takes place over the 6 days post-hatching, when larvae are intensively fed by nurse bees and grown exponentially. Thus, it is likely that larvae are exposed to a risk during the early stages of its development.

In this study, we determined as a first step the acute toxicity of thymol-contaminated food for larvae reared *in vitro*. In a second step, we investigated the chronic toxicity of thymol by focusing on gene expression and enzymatic activity of proteins involved in immunity, detoxification and development of larvae and pupae. Then, we compared our results with the available data on thymol residues levels in a colony to assess the risk for honeybee larvae.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Hives and larvae set-up

All experiments were performed during the spring of 2010, with a mixture of larvae from four Buckfast colonies (crossed with the *Apis mellifera mellifera* honeybee) provided by the APIREM Company (Saint-Juery, France) and maintained in the Jean-François Champollion University Center. The queen bee was confined to a defined area on a comb containing empty cells for 30 h to control the age of the brood. Half of the brood was used for investigation of the effects of toxicants on the parameters of development under laboratory conditions and the other half was used as a control.

2.2 Larval rearing and exposure to toxicants

The *in vitro* rearing was conducted according to the procedure described by Aupinel *et al.*²² with a few modifications. This approach allows controlling the thymol exposure during larval development, thus reducing experimental bias caused by pathogens and chemicals present inside the hive. It was further supported by good between-laboratory reproducibility²³ and has been proposed to improve the risk assessment of pesticides for honeybee health.^{24,25} In our experiments, only early second-instar larvae were grafted. The royal jelly in the diet was furnished by the Chanteclair miellerie (Chanlencon, France), larvae were grafted using a picking instead of a paintbrush and sodium dichloroisocyanurate (Micropur forte®; Katadyn, Kempthal, Switzerland) was used instead of methyl benzethonium chloride.

Larvae were exposed to thymol using a feeding method adapted from Aupinel *et al.*²⁶ Before each experiment, the required amount of diet including different concentrations of thymol, as described below, was prepared the day before the experiment and stored at 4 °C. Briefly, seven stock solutions of thymol (0.1, 0.5, 5, 10, 50, 100, 300 mg mL⁻¹) were prepared by dissolving thymol crystals (99.5%; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in acetone and diluted in feeding mixture to obtain a final concentration of 1, 5, 50, 100, 500, 1000, 3000 mg of thymol and 1% acetone kg⁻¹ food.

Second-instar larvae were divided into experimental groups of 30 individuals grafted in plastic queen cups and inserted in 48-well cell culture plates (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) as follows: (1) control larvae, (2) larvae exposed to acetone, (3) larvae exposed to a gradient concentration of thymol, and (4) larvae exposed to

dimethoate (10 mg kg⁻¹ food) as a reference toxicant. To control the effect of thymol vapours on larvae survival, control plates containing only larvae fed with untreated food and acetone-treated food were incubated in separate thymol-free hermetic Plexiglas desiccators.

The 48 h-LD₅₀ was determined from three independent trials by feeding second-instar larvae with 0, 0.0011, 0.0022, 0.011, 0.022 and 0.066 mg of thymol per larva. The chronic toxicity (6 day-LC₅₀) of thymol was tested in larvae feeding until the fifth-instar larvae using the following concentration gradient: 0, 1, 5, 50, 100, 500, 1000 and 3000 mg kg⁻¹ food. The individuals were monitored daily under a stereomicroscope.

Each day, larval survival was recorded and dead individuals were removed. Dead larvae were recognised by immobility of their stigmata, and dead prepupae and pupae by occasional black or white sub-dermal necrotic stains or visible wilting.

The transcriptomic and enzymatic analysis were performed on third- and fifth-instar larvae, prepupae and white eyes pupae exposed to six thymol concentrations (1, 5, 50, 100, 500 and 1000 mg kg⁻¹ food). Sampled individuals were weighed using a TE124S balance (Sartorius, Aubagne, France) then stored in a 1.5 mL Eppendorf (VWR) at -80 °C for mRNA and protein extractions.

2.3 RNA isolation and cDNA synthesis

The frozen individuals were crushed in a 1.5 mL Eppendorf vial using a sterile RNase free pestle (VWR). Total RNA was extracted from individual samples using TRI® reagent (Sigma), air dried and re-suspended in sterile RNase-free water. RNA concentration was estimated spectrophotometrically at 260 nm using the microplate autoreader Infinite M200 (Tecan, Lyon, France) and quality was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel. A template omission control was performed for each group. Total RNA was converted to first-strand cDNA using the AMV-RT and random hexanucleotides according to the manufacturer's protocol (Sigma). A reverse transcriptase omission control was performed for each group. cDNA volume was then adjusted to 40 µL with sterile water and stored at -20 °C until use.

2.4 RTQ-PCR standard curves

Absolute quantification was achieved for each studied gene using a standard curve. PCR were performed using the following program: denaturation at 95 °C for 10 min, 39 cycles were performed with amplification at 95 °C for 30 s, 59 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and final elongation at 72 °C for 5 min using a Mastercycler® Gradient (Eppendorf, Le Pecq, France). Amplicons were checked for length on 1% agarose gel electrophoresis and DNA bands were cut off and then purified on a GenElute™ Agarose Spin Column (Sigma) before ligation into the pGEM®-T Vector System (Promega, Lyon, France). Cloned products were transformed into *Escherichia coli* JM109 (Sigma) competent cells according to the manufacturer's protocol. Plasmids were isolated by using GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit (Promega) and quantified by spectrophotometry at 260 nm. The standard curves were constructed with serial 10-fold dilutions of the pGEM-T, ranging from 1 × 10¹ to 1 × 10⁹ copies µL⁻¹.

2.5 Real-time PCR

All amplification reactions were performed in duplicate and reverse transcriptase negative controls were used in order to check for genomic DNA contamination. Replicate external standards consisted in amplification with 1 × 10⁵ constructed plasmid.

Briefly, 2 μ L of FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Master Mix[®] (Roche Diagnostics, Meylan, France) was mixed with 0.1 μ L primers (1 μ M final concentration) and 1 μ L of template in a final volume of 10 μ L. Polymerisation chain reaction was performed in capillary tubes using a LightCycler[®] (Roche Diagnostics). Cycling conditions were 95 °C for 10 min, 45 cycles of amplification at 95 °C for 10 s, 59 °C for 10 s and 72 °C for 10 s. Amplifications were performed using previously published primers: actin,²⁷ abaecin,²⁸ lysozyme,²⁸ phenol oxidase,²⁸ vitellogenin,²⁹ serpin 5,³⁰ serine protease 14³⁰ and ribosomal protein 49 designed using OligoArchitect[™] (Sigma); forward: CAGAGTGATCGTTACAGTA and reverse: TTGAGCACCGTTCAACAAT. The PCR cycles were followed by melting curve analysis according to the manufacturer's protocol (Roche Diagnostics) and by checking the size of the final product on a 1.5% agarose gel.

2.6 Enzyme assays

Biochemical analyses were performed using the microplate autoreader Infinite M200 (Tecan) spectrophotometer and chemical products were purchased from Sigma. Protein concentration was measured using the Bradford method with bovine serum albumin as the standard according to the manufacturer's protocol. Enzyme activities were analysed in each individual after homogenisation performed as previously described by Yang and Cox-Foster.³¹ Briefly, each individual was crushed in 500 μ L Tris–HCl 0.1 M (pH = 7) using a mortar and a pestle. The suspension was centrifuged at 16 000 $\times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatant was immediately stored at –20 °C until use. All enzymatic assays were carried out twice in technical replicates.

2.6.1 Lysozyme activity

The lysozyme assay, previously described by Newton *et al.*,³² was performed using 185 μ L of 4-nitrophenyl β -D-N,N',N''-triacylchitotriose (0.01 mg mL^{–1}) in Tris–HCl 0.1 M (pH = 7) added to 15 μ L of homogenate. After 20 min of incubation at room temperature, enzymatic activity was evaluated at 415 nm, including chicken egg-white lysozyme as a positive control.

2.6.2 Glucose oxidase activity

Glucose oxidase activity was measured using the method described by Merx-Jacques and Bede.³³ Briefly, light absorption was measured at 460 nm using a mixture of 10 μ L of homogenate and 190 μ L of reaction buffer (D-glucose 1 M, horseradish peroxidase 25 μ g mL^{–1}, o-dianisidine-HCl 5 μ g mL^{–1} in phosphate-buffered saline 0.2 M pH = 6.0) incubated for 20 min at room temperature. Glucose oxidase derived from *Aspergillus niger* was used as control.

2.6.3 Glucose dehydrogenase activity

Glucose dehydrogenase activity was determined spectrophotometrically at 600 nm following the protocol described by Lovallo and Cox-Foster.³⁴ Ten microlitres of homogenate was mixed with 190 μ L of reaction buffer (2,6-dichlorophenolindophenol 48 μ M, D-glucose 150 mM in Tris–HCl 0.1 M pH = 6.8) and incubated for 1 min at room temperature.

2.6.4 Phenol oxidase activity

Phenol oxidase activity was measured as described by Yang and Cox-Foster.³¹ Briefly, 15 μ L of homogenate mixed with 185 μ L L-DOPA 0.02 M in Tris–HCl 0.1 M pH = 7 and incubated 40 min at room temperature. Enzymatic activity was evaluated at 490 nm, including a tyrosinase positive control.

2.6.5 Glutathione-S-transferase activity

Glutathione-S-transferase (GST) activity was spectrophotometrically assayed by measuring the conjugation of reduced glutathione (GSH) to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene using a method adapted from Habig *et al.*³⁵ The GST activity was measured by adding enzymatic extract to the reaction mixture containing 1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 100 mM Na/K-phosphate pH = 7.4. Glutathione-S-transferase activity was quantified by recording the appearance of conjugated product at 340 nm during 5 min.

2.7 Statistical analysis

The statistical analyses were performed essentially as described by Hendriksma *et al.*³⁶ Briefly, analyses were performed using the open source statistic software R version 2.11.1 (r-project.org). When models were applied, thymol concentrations and trials were always included as predictive and random factor respectively in accordance with Hendriksma *et al.*³⁶ When multi-comparisons were performed, the alpha risk was lowered using the Bonferroni correction coefficient.

2.7.1 Survival analysis

Survival analyses were performed using the Cox proportional hazards regression model³⁷ included in the R package 'survival'. The model applied to analyse effects of treatment on mortality include thymol, dimethoate and thymol vapours as covariates and trial as frailty. A post hoc analysis with the replicates background of test larvae as a random factor was performed using a G-rho family of tests in order to determine the lowest concentration inducing a significant mortality (survdiff function package MASS).

2.7.2 48 h-LD₅₀ and 6 day-LC₅₀ analysis

A generalised linear model providing a binomial–logit logistic regression model was fitted on survival data of a 48 h thymol exposed second-instar larvae. The fitting of this model was adjusted using the Pearson χ^2 test. The lethal dose 50 (LD₅₀) value was estimated using the function dose.p of the 'MASS' package and the 95% confidence interval was calculated using the standard error. The same procedure was applied to estimate the 6 day-LC₅₀.

2.7.3 Body mass, transcriptomic and enzymatic analysis

Exploratory statistics were first performed to determine which physiological parameters were likely to covariate with thymol doses. A generalised linear model providing a Gaussian regression model was fitted on vitellogenin expression data. The lowest observed effect level (LOEL) was determined as the lowest dose of thymol that induced a significant effect on vitellogenin expression. For this purpose, the non-parametric Kruskal–Wallis test (package MASS) was used. The alpha risk was lowered using the Bonferroni correction factor. Data on body mass were processed in the same manner except that the high heterocedasticity of the data of fifth-instar larvae mass did not allow us to fit a model.

3 RESULTS

Acute and chronic effects of thymol exposure on larvae reared with contaminated food were assessed according to the methodology developed by Aupinel *et al.*²² Survival, body mass, transcript level of abaecin, lysozyme, phenol oxidase,

serine protease 14, serpin-5 and vitellogenin and enzymatic activity of glucose deshydrogenase, glucose oxidase, glutathione-S-transferase, lysozyme and phenol oxidase were selected as endpoints of thymol toxicity on larvae, prepupae and pupae. No significant effect was found for the confounding factors acetone ($P = 0.38$) and vapour thymol ($P = 0.85$).

3.1 Acute toxicity of thymol

The acute toxicity was assessed for second instars larvae 48 h after feeding with a single dose of toxicant. The reference toxicant dimethoate introduced in our experimental design induces a very highly significant decrease of larval survival ($P < 0.0001$) in accordance with Aupinel *et al.*²⁶ The Cox proportional hazard regression model indicates a very highly significant effect of thymol on survival of larvae ($P < 0.0001$; Table 1). The generalised linear mixed model approach showed a thymol 48 h-LD₅₀ of 0.044 mg larva⁻¹ with 95% confidence interval of 0.038–0.050 mg larva⁻¹ ($n = 540$) that correspond to a 48 h-LC₅₀ of 2010 mg kg⁻¹ food (Fig. 1).

3.2 Chronic toxicity of thymol

Chronic toxicity was assessed during the 6 day feeding period of larval development by monitoring survival and body mass. The reference toxicant dimethoate induces a very highly significant decrease of larval survival ($P < 0.0001$) without affecting the larvae body mass ($P = 0.35$) as previously observed (Aupinel *P*, 2010, personal communication). Results showed a very highly significant effect of thymol on larval survival during this period ($P < 0.0001$; Table 1). The post hoc comparison tests showed a dose–effect from 100 to 3000 mg kg⁻¹ food (0.017–0.528 mg larva⁻¹) (Table 2, Fig. 2). The generalised linear mixed model approach showed a thymol 6 day-LC₅₀ of 703 mg kg⁻¹ ($n = 540$) with 95% confidence

Table 1. Effect of thymol introduced in larval food on survival of honeybee larvae, prepupae and pupae reared *in vitro*

Endpoint	Effect	χ^2	P -value ^a
Survival (D0–D2)	Treatment	153	<0.0001***
	Trial	0	<0.0001***
Survival (D0–D6)	Treatment	417	<0.0001***
	Trial	5.4	0.056
Survival (D6–D10)	Treatment	29.6	<0.0001***
	Trial	14.2	<0.0001***

Larvae were reared *in vitro* for 48 h from the start of the treatment (D0–D2), up to the end of the feeding period (D0–D6) and from the end of the feeding period to the pupal stage (D6–D10).

Larvae were fed with thymol contaminated food (from 1 to 3000 mg kg⁻¹ of food). Negative controls consisted of larvae fed with acetone-contaminated food and reared in a thymol-free desiccator. The P -values were obtained from the endpoints survival using the Cox proportional hazards regression model.

^a Results significantly different from the control (acetone) are indicated with an asterisk; *** $P < 0.001$.

interval of 600–829 mg kg⁻¹ food. Following the feeding period, a very highly significant decrease of prepupal and pupal survival was observed for individuals previously exposed to 500 mg ($P < 0.0001$) and 1000 mg ($P < 0.0001$) thymol kg⁻¹ food (Table 2). Body mass of larvae was assessed over the feeding period as the endpoint for chronic toxicity. A very highly significant decrease of larval mass occurred at the day 6 of exposure to 500 mg ($P < 0.0001$) and 1000 mg ($P < 0.0001$) thymol kg⁻¹ food (Fig. 2). In addition, the daily observation revealed that, in the plastic queen cells containing the smallest larvae, food remained at the end of the feeding period.

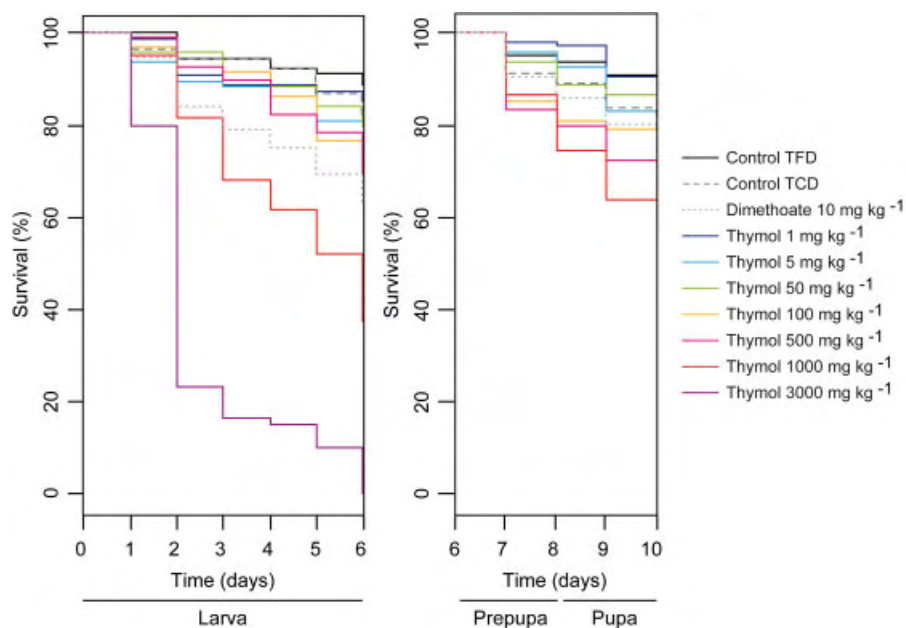


Figure 1. Effects of thymol on survival of honeybee larvae reared *in vitro* with contaminated food. Dynamic of survival from the start of the treatment (day 0) up to the end of the feeding period (day 6) are shown in the left panel. Dynamic of survival of honeybee prepupae and pupae reared from the end of the treatment (day 6) up to the pupal transition (day 10) are shown in the right panel. Survival characteristics of larvae are indicated by a Cox proportional hazards regression model. Larvae were fed with thymol-contaminated food (coloured solid lines), or dimethoate contaminated food (grey dotted line) as positive control. Negative controls consisted of larvae fed with acetone-contaminated food and reared in a thymol-free desiccator (TFD, black solid line) or in a thymol vapour-contaminated desiccator (TCD, grey dashed line).

Table 2. Effect of several concentrations of thymol introduced in larval food on survival of honeybee larvae, prepupae and pupae reared *in vitro*

Thymol concentration (mg kg ⁻¹ of food) ^a	D0–D6		D6–D10	
	χ^2	<i>P</i> -value ^b	χ^2	<i>P</i> -value ^b
3000	149	< 0.0001***	—	—
1000	52.1	< 0.0001***	24	< 0.0001***
500	10.4	0.0012*	15.6	< 0.0001***
100	6.2	0.013	5.1	0.023
50	2.7	0.10	0.2	0.65
5	2.9	0.088	0.3	0.60
1	0.6	0.45	0.2	0.69

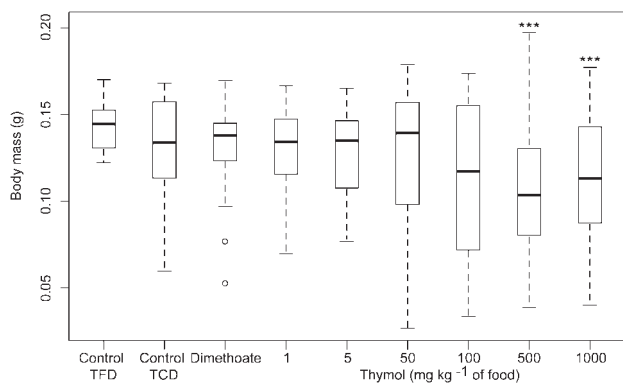
Larvae were reared *in vitro* from the start of the treatment (D0) to the end of the feeding period (D6) and from the end of the feeding period to the pupal stage (D10).

Larvae were fed with thymol-contaminated food (from 1 to 3000 mg kg⁻¹ of food).

The *P*-values were extracted from the post hoc analysis of a Cox proportional hazards regression model fitted on survival data.

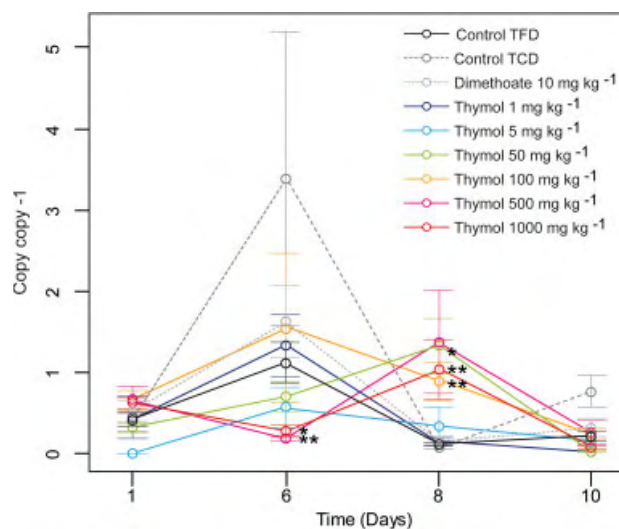
^a Concentration of thymol in larval food.

^b Results significantly different from the control (acetone) are indicated with asterisk after correction of the alpha risk using the Bonferroni–Holm's method; **P* < 0.05; ****P* < 0.001.

**Figure 2.** Effects of thymol on body mass of honeybee larvae reared *in vitro* for 6 days with contaminated food. Larvae were fed with thymol contaminated food (from 1 to 1000 mg kg⁻¹ food), or dimethoate contaminated food (10 mg kg⁻¹ food) as positive control. Negative controls consisted in larvae fed with acetone contaminated food and reared in a thymol free desiccator (TFD) or in a thymol vapour contaminated desiccator (TCD). Results significantly different from the control (acetone) are indicated with asterisk after correction of the alpha risk using the Bonferroni–Holm's method; ****P* < 0.001.

3.3 Effects of thymol on physiological parameters

The effects of chronic exposure to thymol were evaluated for several physiological parameters from the larval development to the white eyes pupal stage. The transcript levels of abaecin, lysozyme, phenol oxidase, serine protease 14, serpin-5 and vitellogenin and activities of glucose dehydrogenase, glucose oxidase, glutathione-S-transferase, lysozyme and phenol oxidase were assessed for larval, prepupal and pupal stages. Results of the transcriptomic and enzymatic analysis showed no significant variation between control and individuals exposed to thymol except concerning vitellogenin expression. Indeed, while vitellogenin expression increased in controls during the larval

**Figure 3.** Effects of thymol on the time course of vitellogenin expression in honeybee larvae reared *in vitro*. Larvae were fed with thymol contaminated food (coloured solid lines), or dimethoate contaminated food (grey dotted line). Negative controls consisted of larvae fed with acetone-contaminated food and reared in a thymol-free desiccator (TFD, black solid line) or in a thymol vapour-contaminated desiccator (TCD, grey dashed line). Results significantly different from the control (acetone) are indicated with asterisk after correction of the alpha risk using the Bonferroni–Holm's method; **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

development to reach a maximum at the fifth instar stage, as described by Guidugli *et al.*,³⁸ this maximum was reached at the prepupal stage for individuals exposed to thymol from 50 mg kg⁻¹ food (*P* = 0.0006); (Fig. 3). Thus, a LOEL of 0.009 mg thymol larva⁻¹ was seen for vitellogenin expression. Interestingly, exposure of larvae to the reference toxicant dimethoate had no effect on any of the physiological parameters monitored.

4 DISCUSSION

Honeybee larvae are exposed to a wide range of toxicants including agrochemicals and veterinary products through contaminated wax and food. Assessing the deleterious effects of chemical residues in the hive constitutes therefore a main concern to evaluate the risk to honeybee health. In this study, we used an *in vitro* approach, focusing in particular on the risk faced by developing larvae exposed to thymol-contaminated food.

Acute toxicity tests revealed a 48 h-LD₅₀ for thymol in larval food of 0.044 mg larva⁻¹. The route of exposure was difficult to define in our experimental set-up, since larvae float in their food and are exposed to thymol both orally and topically. Nevertheless, comparing our value of acute toxicity and that found for fifth-instar larvae by Gashout and Guzmán-Novoa¹⁹ after a topical application, we observe that an equivalent dose of thymol requires 10-fold longer times to kill 50% of the individuals by feeding than by contact. This indicates that only a small proportion of thymol passes through the larval cuticle, which allows us to assume that larvae were primarily exposed to thymol by the oral route. Unfortunately, it is not possible to compare our data to the values of topical¹⁹ and inhalation³⁹ toxicities of thymol, given that they were obtained with experimental conditions (larval stage, exposure time) different from ours. Thus, assessing the acute toxicity of thymol using standardised experimental conditions for each exposure route would be of great interest in order to determine which is the most hazardous for developing larvae.

Few data on acute toxicity of pesticides orally administered to honeybee larvae are available.^{36,40} Thus, compared to the 48 h-LD₅₀ of cypermethrin (0.00006 mg larva⁻¹), endosulfan (0.028 mg larva⁻¹), malathion (0.00074 mg larva⁻¹), methidathion (0.00027 mg larva⁻¹), menvinphos (0.00044 mg larva⁻¹) and dimethoate (0.0017 mg larva⁻¹), the higher value of acute toxicity found in our study indicates that thymol is less toxic for honeybee larvae than others chemical neurotoxicants. In addition, the oral 48 h-LD₅₀ of thymol on honeybee larvae is in the range of those obtained for the Lepidopteran *Spodoptera litura*,⁴¹ the Coleopteran *Coleoptera elateridae*⁴² and the Dipteran *Drosophila melanogaster*,⁴³ indicating that honeybee larvae are not especially sensitive to thymol if compared to other insects. This result is consistent with Hardstone and Scott,⁴⁴ who observed that, despite the fact that honeybees have fewer genes involved in detoxification than other insects, they are not especially sensitive to pesticides. Altogether, these observations suggest that the acute toxicity of thymol does not present an alarming profile for developing larvae.

In order to assess more subtle effects on larval development, we investigated the chronic toxicity of thymol and its sub-lethal effects on larvae, prepupae and pupae. Studying the survival of larvae over their feeding period, we did not observe an inconsistent discrepancy between acute and chronic toxicities of thymol (48 h-LC₅₀ of 2010 mg kg⁻¹ and 6 day-LC₅₀ of 700 mg kg⁻¹ food, respectively).

The low acute:chronic ratio seems to indicate that thymol toxicity is not increased over chronic exposure as described for other toxicants.^{45,46} This is probably related to the fact that, in larvae, the activities of thymol-detoxification enzymes are unchanged whatever the duration of exposure. The stability of the GST activity observed over the exposure to thymol tends to substantiate this claim.

It appears more generally that chronic exposure to thymol does not induce great physiological disturbances in larvae. The lack of effects on the developmental markers recorded is, indeed, somewhat surprising. In contrast to the results from Boncristiani *et al.*,¹³ we did not observe a down-regulation of immune gene expression. Thus it can be hypothesised that immunity and energetic metabolism are neither targeted by thymol nor indirectly affected by its deleterious effects. In the same way, the decrease of body mass for larvae exposed to high concentrations of thymol and the observation of remaining food in cupules containing undersized individuals, suggest a neurotoxic effect of thymol on larval feeding behaviour. However, a metabolic or physiological defect cannot be excluded.

Interestingly, the time course of vitellogenin expression was highly modified in individuals exposed to sub-lethal concentrations of thymol from 50 mg kg⁻¹ food. This result is in accord with those obtained by Boncristiani *et al.*,¹³ who, in a field test, found a decrease in vitellogenin transcript levels in adult bees. As suggested by Boncristiani *et al.*,¹³ the impairment of vitellogenin regulation by thymol and others acaricides could have a very harmful effect leading to perturbation in life-history traits of honeybees due to the pleiotropic effect of this glycoprotein.

As dimethoate, thymol is known mainly to act as a neurotoxicant in insects by binding gamma-aminobutyric acid receptors (GABARs), transient receptor potential channel (TRP), tyramine receptor (TyrR) in nerve cell membranes.^{47–49} In our study, only thymol has an effect on larval mass and vitellogenin expression, suggesting that thymol could also exhibit non-neurotoxic effects. In this context, investigations aiming to specify mechanisms

involved in the modulation of the vitellogenin expression pattern of honeybees exposed to thymol would be of great interest. In this way, it would be interesting to test the circumstantial hypothesis proposed by Boncristiani *et al.*¹³ that the modulation of vitellogenin is linked to an altered hormone metabolism.

In the hive, if we consider the oral exposure to thymol, brood is exposed during the larval stage through the food provided by nurses. This food consists of royal jelly for 3 days after hatching and in a mixture of royal jelly, honey and pollen, called larval food, for the next 2 days.^{50,51} Thus, royal jelly and larval food are susceptible to be contaminated both directly with thymol vapour during treatment and indirectly through residues remaining in pollen and honey. To our knowledge, the level of thymol residues in royal jelly is unknown. Nonetheless, on the basis of the study published by Smodis Skerl *et al.*,⁵² which found acaricides coumaphos and fluvalinate in royal jelly, it can be hypothesised that thymol could accumulate in the same way. This seems even more likely as thymol is known for its volatility and its propensity to accumulate rapidly in all bee products.¹⁴ Similarly, there are no data, to our knowledge, on residue levels of thymol in larval food. However, a few data on honey and pollen contamination are available: in honey, thymol residues ranging from 0.4 to 8.8 mg kg⁻¹ and 0.02 to 0.48 mg kg⁻¹ were found, respectively, 7 days after treatment with Apiguard®,¹⁵ and 9 months after treatment with Apilife VAR®.¹⁴ In pollen, a higher range of thymol content from 0.037 to 39.7 mg kg⁻¹ was found.¹⁶ Associating these residue levels with the amounts of honey (75.2 mg) and pollen (5.4 mg) consumed by larvae during their development,⁵³ larvae could ingest in the worst case 0.2 µg and 0.6 µg of thymol, respectively. This dose (0.0008 mg larva⁻¹) is 10 times lower than the LOEL of thymol on vitellogenin expression (0.009 mg larva⁻¹). Although this scenario of exposure remains incomplete because the residue levels in royal jelly are lacking, it seems unlikely that the thymol level found in royal jelly will achieve the LOEL in environmental conditions. However, to confirm this assumption, a precise quantification of thymol residues in royal jelly or, more ideally, in larval food is required.

5 CONCLUSION

In this study, we have provided experimental data showing that oral exposure to thymol is not a risk of prime importance during the larval development of honeybees. However, evidence of sub-lethal effects of thymol on vitellogenin expression indicates a more complex picture. With regard to the level of thymol that alters vitellogenin expression, the possibility cannot be excluded that thymol residues can impinge on the health of the colony through slight modifications of the honeybee life-history traits. Investigations on the level of thymol residues in royal jelly and, more generally, in food stores should be performed with a view to improving the risk assessment for larvae. Finally, we believe that efforts should be made to complete the toxicological profile of thymol by focusing particularly on the potential deleterious effects of waxes highly contaminated with thymol. For this purpose, an adaptation of the *in vitro* method of Aupinel *et al.*,²² allowing the rearing of larvae in wax cups, seems desirable.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by the Conseil Général du Tarn, Région Midi-Pyrénées and the Centre Universitaire de Formation et de Recherche Jean-François Champollion; Gaël Charpentier is funded by a grant from the APIREM company with the help of the Conseil

Général du tarn. The authors would like to thank Anne and Bernard Remuau from APIREM company for furnishing honeybee colonies and apicultural assistance; Aupinel Pierrick and Fortini Dominique from Unité expérimentale d'entomologie INRA le Magneraud, Surgeres, France, for their valuable advice for larvae rearing; and David J. Read (MRC Toxicology Unit, Leicester, UK) for proofreading the manuscript.

REFERENCES

- Rosenkranz P, Aumeier P and Ziegelmann B, Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol* **103**:96–119 (2010).
- Aronstein KA, Saldivar E, Vega R, Westmiller S and Douglas AE, How *Varroa* parasitism affects the immunological and nutritional status of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insects* **3**(3):601–615 (2012).
- Alaux C, Dantec C, Parrinello H and Le Conte Y, Nutrigenomics in honey bees: Digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *Varroa*-parasitized bees. *BMC Genomics* **12**:496–510 (2011).
- van Dooremalen C, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen JJM, van Langevelde F and Blacquière T, Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. *PLoS One* **7**(4):e36285 (2012).
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, et al., A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**:283–287 (2007).
- van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, et al., Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One* doi:10.1371/ps.0006481 (2009).
- Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L and Neumann P, Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS One* doi:10.1371/ps.0032151 (2012).
- van Engelsdorp D, Hayes Jr J, Underwood RM and Pettis JS, A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J Apic Res* **49**:7–14 (2010).
- Lodesani M, Colombo M and Spreafico M, Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* **26**:67–72 (1995).
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Van engelsdorp D, et al., High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *PLoS One* Mar 19; **5**(3):e9754 (2010).
- Burley LM, Fell RD and Saacke RG, Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J Econ Entomol* **101**:1081–1087 (2008).
- Gregorc A, Evans JD, Scharf M and Ellis JD, Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). *J Insect Physiol* **58**:1042–1049 (2012).
- Boncrisiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J and van Engelsdorp D, Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* **58**:613–620 (2012).
- Bogdanov S, Imdorf A and Kilchenmann V, Residues in wax and honey after Apilife var treatment. *Apidologie* **29**:513–524 (1998).
- Floris I, Satta A, Cabras P, Garau VL and Angioni A, Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *J Econ Entomol* **97**:187–191 (2004).
- Rennich K, Pettis J, van Engelsdorp D, Bozarth R, Eversole H, Roccasecca K, et al., 2011–2012 National Honey Bee Disease & Pest Survey Report. Available: http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2011_National_Survey_Report.pdf [March 2012].
- Adamczyk S, Laázaro R, Peáñez-Arquillueä C, Conchello P and Herrera A, Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-*Varroa* treatments. *J Agric Food Chem* **53**:10085–10090 (2005).
- Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Gonzalez MJ and Higes M, Extraction of thymol, eucalyptol, menthol and camphor residues from honey and beeswax. Determination by gas chromatography with flame ionization detection. *J Chromatogr A* **954**:207–215 (2002).
- Gashout AH and Guzmán-Novoa E, Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera*). *J Apicult Res* **48**:263–269 (2009).
- Mattila HR, Otis GW, Daley J and Schulz T, Trials of apiguard, a thymol-based miticide part 2. Non-target effects on honey bees. *Am Bee J* **140**:68–70 (2000).
- Imdorf A, Kilchenmann V and Bogdanov S, Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud. und *Apis mellifera* L. im Labortest. *Apidologie* **26**:27–31 (1995).
- Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei JN, Michaud B, Odoux JF, et al., Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bull Insect* **58**:107–111 (2005).
- Aupinel P, Fortini D, Michaud B, Medrzycki P, Padovani E, Przygoda D, et al., Honey bee brood ring-test: Method for testing pesticide toxicity on honeybee brood in laboratory conditions. *Julius-Kühn-Archiv* **423**:96–102 (2009).
- Alix A, Chauzat MP, Duchard S, Lewis G, Maus C, Miles MJ, et al., Hazards of Pesticides to Bees: 10th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, ed. by Oomen PA and Thompson HM. Julius-Kühn-Archiv, Romania, pp. 15–27 (2009).
- COLOSS WG 3 Workshop *In vitro Larval Rearing Workshop*. Available: <http://www.coloss.org/publications/la-rochelle-france-18-19-november-2011-in-vitro-larval-rearing-workshop>. [November 2011]
- Aupinel P, Fortini D, Michaud B, Marolleau F, Tasei JN and Odoux JF, Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest Manag Sci* **63**:1090–1094 (2007).
- Chen YP, Higgins JA and Feldlaufer MF, Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera*). *Appl Environ Microbiol* **71**:436–441 (2005).
- Yang X and Cox-Foster DL, Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7470–7475 (2005).
- Koywiwattrakul P, Thompson GJ, Sitthipraneed S, Oldroyd BP and Maleszka R, Effects of carbon dioxide narcosis on ovary activation and gene expression in worker honeybees, *Apis mellifera*. *J Insect Sci* **18**:5–36 (2005).
- Zou Z, Lopez DL, Kanost MR, Evans JD and Jiang H, Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. *Insect Mol Biol* **15**:603–614 (2006).
- Yang X and Cox-Foster D, Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* **134**:405–412 (2007).
- Newton K, Peters R and Raftos D, Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Dev Comp Immuno* **28**:565–569 (2004).
- Merkx-Jacques M and Bede JC, Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *J Insect Sci* **48**:1–9 (2005).
- Lovall N and Cox-Foster DL, Alteration in FAD-glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *J Insect Physiol* **45**:1037–1048 (1999).
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**:7130–7139 (1974).
- Hendriksma HP, Härtel S and Dewenter IS, Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods Ecol Evol* **2**:509–517 (2011).
- Fox J, *Cox Proportional-Hazards Regression for Survival Data*. Available: <http://cran.r-project.org/doc/contrib/Fox-Companion/appendix-cox-regression.pdf> [February 2002]
- Guidugli KR, Piulachs MD, Bellés X, Lourenço AP and Simões ZL, Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* **59**:211–218 (2005).
- Imdorf A, Bogdanov S, Kilchenmann V and Berger T, The acaricidal effects of essential oils from thyme, salvia and hyssop plants (from left to right) have been tested against *Varroa destructor*. *ALP Sci* **495**:3–18 (2006).
- Atkins EL and Kellum D, Comparative morphogenic and toxicity studies on the effect of pesticides on honeybee brood. *J Apicult Res* **25**:242–255 (1986).

- 41 Hummelbrunner LA and Isman MB, Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J Agric Food Chem* **49**:715–720 (2001).
- 42 Waliwitiya R, Isman MB, Vernon RS and Riseman A, Insecticidal activity of selected monoterpenoids and rosemary oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae). *J Econ Entomol* **98**:1560–1565 (2005).
- 43 Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG and Mavragani Tsipidou P, Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agric Food Chem* **46**:1111–1115 (1998).
- 44 Hardstone MC and Scott JG, Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Manag Sci* **66**:1171–1180 (2010).
- 45 Suchail S, Guez D and Belzunces LP, Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ Toxicol Chem* Nov;**20**(11):2482–6 (2001).
- 46 Dom N, Penninck M, Knapen D and Blust R, Discrepancies in the acute versus chronic toxicity of compounds with a designated narcotic mechanism. *Chemosphere* **87**:742–749 (2012).
- 47 Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA and Sattelle DB, Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br J Pharmacol* **140**:1363–1372. (2003).
- 48 Enan EE, Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochem Mol Biol* **35**:309–321 (2005).
- 49 Parnas M, Peters M, Dadon D, Lev S, Vertkin I, Slutsky I, et al., Carvacrol is a novel inhibitor of *Drosophila* TRPL and mammalian TRPM7 channels. *Cell Calcium* **45**:300–309 (2009).
- 50 Brouwers EVM, Ebert R and Beetsma J, Behavioural and physiological aspects of nurse bees in relation to the composition of larval food during caste differentiation in the honeybee. *J Apicult Res* **26**:11–23 (1987).
- 51 Asencot M and Lensky Y, The effect of soluble sugars in stored royal jelly on the differentiation of female honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae to queens. *Insect Biochem* **18**:127–133 (1988).
- 52 Smodis Skerl MI, Kmecl V and Gregorc A, Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Bull Environ Contam Toxicol* **85**:125–128 (2010).
- 53 Rortais A, Arnold G, Halm MP and Touffet-Briens F, Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: Estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* **36**:71–83 (2005).