

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Ecole Doctorale 536 « Agrosociences et Sciences »

Laboratoire de Toxicologie Environnementale

UR 406 Abeilles & Environnement, INRA

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur
de l'Université d'Avignon

*Effets des stressseurs environnementaux
sur la reproduction de l'abeille
domestique (Apis mellifera L.) :
action par une exposition des mâles*

présentée par Guillaume KAIRO

sous la direction de Luc P. BELZUNCES et Jean-Luc BRUNET

soutenue publiquement le 16 décembre 2016

Membres du jury :

- Rapporteurs : Dr Christelle ADAM-GUILLERMIN, Directeur de Recherche, IRSN Cadarache
Dr Catherine ARMENGAUD, Maître de Conférences, Université Toulouse III
- Examineurs : Dr David BIRON, Chargé de Recherche, CNRS Université de Clermont-Ferrand
Pr Huguette SALLANON, Professeur, Université d'Avignon
- Directeur de Thèse : Dr Luc P. BELZUNCES, Directeur de Recherche, INRA d'Avignon
- Co-encadrant de Thèse : Dr Jean-Luc BRUNET, Ingénieur d'Etudes, INRA d'Avignon

Remerciements

Cette thèse, financée par la région PACA et le département SPE de l'INRA, a été réalisée dans le Laboratoire de Toxicologie Environnementale de l'UR 406 « Abeilles & Environnement » de l'INRA d'Avignon. Je remercie ces institutions pour leur soutien financier ainsi que la société « Remuaux Apiculture » et son gérant Cyrille Remuaux pour son parrainage, son aide financière et nos échanges.



Je remercie les membres de mon jury de thèse, M^{me} Christelle Adam-Guillermin et M^{me} Catherine Armengaud, Rapporteurs, ainsi que M^{me} Huguette Sallanon et M^r David Biron, de me faire l'honneur de juger mon travail.

La réalisation de cette thèse a été une expérience unique, très enrichissante, mais parsemée d'embûches et particulièrement éprouvante par moments. A l'heure où ce travail s'achève, les moments difficiles s'effacent pour ne laisser place qu'aux bons moments, à la satisfaction d'y être arrivé et à la reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont entouré ces dernières années, dans ma vie professionnelle et personnelle et, sans lesquelles, ce travail n'aurait pas été possible.

Je remercie chaleureusement Jean-Luc et Luc, mes encadrants de thèse, pour tout ce qu'ils m'ont apporté depuis presque 7 ans : leur bienveillance, leurs conseils avisés, leurs encouragements et leur bonne humeur. Merci pour tout ce que nous avons échangé, pour la liberté d'action que vous m'avez accordée et qui m'aura permis de m'épanouir pleinement dans ce travail de recherche.

Jean-Luc, merci pour t'être démené pour obtenir les financements qui m'ont donné l'opportunité d'approfondir les travaux de stage de master qui m'avaient tant passionné. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée.

Luc, au travers des cours que tu dispensais à l'Université, tu as su éveiller en moi un profond intérêt pour la toxicologie environnementale. De ce fait, tu es à l'origine de mon aventure à l'INRA et pour cela je t'exprime toute ma reconnaissance.

Je vous témoigne à tous les deux ma profonde gratitude ainsi que mon amitié.

Je remercie,

Sylvie Tchamitchian pour son aide précieuse, ses encouragements, les pauses café et sa bonne humeur qui anime si bien ce labo à l'accent méditerranéen. Je te suis reconnaissant pour m'avoir initié aux tests toxicologiques et m'avoir accompagné dans la réalisation des expérimentations. Grâce à toi, j'ai pu avoir quelques week ends de répit !

Marianne Cousin pour son aide précieuse, sa disponibilité et sa gentillesse. Je te remercie de m'avoir formé au pipetage, de m'avoir initié à l'histologie et pour les milliers de photos de spermatozoïdes de faux-bourçons que tu as prises !

Marc Bonnet pour son aide, sa rigueur et son efficacité aussi bien dans le laboratoire de biochimie que dans les ruchers (malgré des débuts difficiles... !). A quand la prochaine course « 48 h dosages » ? Merci, également pour tous les moments de détente et nos réunions chantier !

Yannick Poquet, mon coloc de bureau, vers qui je me tournais systématiquement lorsque j'avais besoin d'un conseil. Merci également pour ton aide sur les ruches et les nombreuses discussions que l'on a pu avoir. Je te remercie pour tous les bons moments passés ensemble que ce soit autour d'une ruche ou autour d'une bière !

Alban Maisonnasse, pour sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements quotidiens (« Ecris ta thèse... ! ») et son amitié. Merci pour tous les bons moments passés en ta compagnie lors des transhumances, des matchs de hand, des parties de pêche et des matchs de rugby que tu commentes avec tant de ferveur...

André Kretzschmar pour ses interventions indispensables en statistiques, des jours improbables comme Noël ou le Nouvel An. Si tu n'as pas réussi à me transmettre le goût des stats, tu m'auras quand même aidé à y voir plus clair dans cette discipline obscure. Pour cela je te remercie énormément.

Michel Pélissier, l'homme à tout faire de l'Unité, sans qui la pièce d'élevage automatisée n'aurait jamais vu le jour. Je te remercie pour ton aide dans la mise en place des dispositifs expérimentaux.

Jacques Sénéchal pour m'avoir initié à l'apiculture, pour la fourniture des ruches et des abeilles et sa participation essentielle lors des inséminations des reines.

Boris, Haïthem, Faten, Claudia, Daiana, Clément, Wilson, Jordan, Quentin, Violette, Pauline, pour leur aide précieuse dans la réalisation des expériences et leur agréable compagnie.

Plus généralement, je remercie l'ensemble des membres du Pôle Abeilles et le Directeur de l'Unité, Yves Le Conte, pour l'accueil et la sympathie qu'ils ont eus à mon égard et les conseils qu'ils ont pu me prodiguer.

Je remercie Bertille Provost, Cyril Vidau et David Biron pour leur participation lors de mes différents comités de thèse et les collaborations qui en ont découlées.

David, je t'exprime toute ma gratitude pour l'accompagnement, la patience et la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard. Merci pour ton accueil lors de mes différents séjours sur Clermont et pour m'avoir fait partager ta vision de la science.

Je remercie tous les copains (du lycée, de la fac, du rugby et ceux rencontrés à l'INRA), pour leurs encouragements, et pour m'avoir permis de temps en temps de me vider l'esprit et de décompresser... !

Je remercie ma famille et mes parents qui ont toujours été là pour me soutenir et m'aider.

Je remercie la famille Rivière, ma belle famille, pour sa gentillesse et son soutien.

Axelle, mes derniers mots te sont destinés. Tu m'as accompagné et supporté jours après jours dans cette aventure. Pour moi, tu as su faire preuve de patience (même si ce n'est pas ta qualité première... !), de compréhension et fait beaucoup de concessions ces dernières années. Je te remercie pour tout cela et pour la tendresse et le réconfort que tu m'apportes.

Table des matières

Remerciements	1
Valorisation du travail de thèse : publications et communications	8

Partie 1

Introduction bibliographique..... 10

I. Les problèmes de fertilité dans le règne animal.....	11
1. Introduction	11
2. La fertilité humaine	12
2.1. L'infertilité.....	12
2.1.1. Infertilité féminine	12
2.1.2. Infertilité masculine.....	13
2.2. Causes de l'infertilité.....	14
2.2.1. Les agents infectieux	14
2.2.2. Les substances chimiques	15
1.3. Effets des facteurs environnementaux sur les populations	16
3. Les troubles de la reproduction animale	17
II. L'abeille domestique.....	18
1. Généralités	18
1.1. Origine.....	18
1.2. Importance de l'abeille domestique	19
1.3. Une espèce en déclin	20
2. Biologie de l'abeille domestique.....	23
2.1. Les différentes castes.....	23
2.2. Le cycle biologique.....	24
2.3. La reproduction sexuée.....	25
2.3.1. Un mode de reproduction singulier : la polyandrie	25
2.3.2. Les reproducteurs	26
2.3.2.1. Le faux-bourdon : anatomie et développement	26

2.3.2.2. La reine : anatomie et développement.....	28
2.3.3. L'accouplement.....	29
2.3.4. Migration des spermatozoïdes vers la spermathèque	31
2.3.5. Détermination du sexe.....	31
2.3.5.1. Fertilisation des œufs	31
2.3.5.2. Détermination génétique du sexe	32
2.3.6. Les spermatozoïdes	32
2.3.6.1. Structure et motilité	32
2.3.6.2. Conservation et métabolisme.....	34
2.3.6.3. Evaluation de la qualité du sperme	35
3. Problématique.....	36

Partie 2

Mise au point d'outils d'étude des effets des stressseurs environnementaux sur la fertilité des faux-bourçons..... 38

Avant-propos.....	39
Résumé	41
Article 1 : Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions	42
Bilan	52

Partie 3

Effets des stressseurs environnementaux sur la fonction de reproduction des mâles et conséquences sur l'appauvrissement de la qualité des reines..... 54

1. L'exposition des faux-bourçons à l'insecticide systémique Fipronil impacte indirectement le potentiel reproducteur des reines.....	55
Avant-propos.....	55
Résumé	57
Article 2 : Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential.....	58
Bilan	71

2. Effets d'une association toxicopathologique sur la physiologie des mâles	72
Avant-propos.....	72
Résumé	74
Article 3 : <i>Nosema ceranae</i> , Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology.....	75
Bilan	107

Partie 4

Vers une évaluation des effets toxiques des produits phytopharmaceutiques sur les faux-bourçons et leur fertilité ? 108

Avant-propos.....	109
Résumé	112
Article 4 : Assessment of the toxicity of pesticides to honey bee drone fertility using laboratory and semi-field approaches: case study with Fipronil	113
Bilan	131

Partie 5

Synthèse et perspectives..... 132

Rappel	133
Stratégies de recherche mises en œuvre.....	133
Bilan des travaux	135
Interrogations et perspectives	137
Au niveau des semences.....	137
Au niveau du faux-bourçon.....	138
Au niveau des reines	139
Au niveau colonial.....	140
Au niveau apicole :	140
Conclusion	141

Références bibliographiques	142
Abstract.....	157
Résumé.....	158

Valorisation du travail de thèse

Liste des publications

Articles publiés

Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Cousin M, Sénéchal J, Benet P, Kretzschmar A, Belzunces LP, Brunet J-L (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci. Reports* 6: 31904. DOI: 10.1038/srep31904.

Dewer Y, Pottier MA, Lalouette L, Maria A, Dacher M, Belzunces LP, **Kairo G**, Renault D, Maibeche M, Siaussat D (2016). Behavioral and metabolic effects of sublethal doses of two insecticides, chlorpyrifos and methomyl, in the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Sci. Pollut. R.* 23(4): 3086-3096. DOI: 10.1007/s11356-015-5710-1.

Poquet Y, **Kairo G**, Tchamitchian S, Brunet J-L, Belzunces LP (2015). Wings as a new route of exposure to pesticides in the honey bee. *Environ. Toxicol. Chem.* 34(9): 1983-1988. DOI: 10.1002/etc.3014.

Ben Abdelkader F, **Kairo G**, Tchamitchian S, Cousin M, Senechal J, Crauser D, Vermandere JP, Alaux C, Le Conte Y, Belzunces LP, Barbouche N, Brunet JL (2014). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45:215-223. DOI: 10.1007/s13592-013-0240-7

Articles soumis

Kairo G, Poquet Y, Haji H, Tchamitchian S, Cousin M, Bonnet M, Pelissier M, Kretzschmar A, Belzunces LP, Brunet J-L (2016). Assessment of the toxicity of pesticides to honey bee drone fertility using laboratory and semi-field approaches: case study with Fipronil. *Environ. Toxicol. Chem.* (article en révision)

Kairo G, Biron DG, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Tchamitchian S, Cousin M, Dussaubat C, Benoit B, Kretzschmar A, Belzunces LP, Brunet J-L (2017). *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Sci. Reports* (article soumis)

Liste des communications

Kairo G, Belzunces LP, Brunet J-L (2015). Effets des tresseurs environnementaux sur la fertilité chez les mâles en relation avec la performance des reines chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L. Conférence, université de Clermont-Ferrand, France, juin 2015). (communication orale)

Kairo G, Ben Abdelkader F, Haji H, Cousin M, Poquet Y, Tchamitchan S, Bonnet M, Sénéchal J, Kretzschmar A, Péliissier M, Belzunces LP, Brunet J-L (2015). How to assess the reproductive toxicity of pesticides in the honey bee (*Apis mellifera*. L)? 25th Annual meeting of the SETAC Europe, Barcelone, Spain, may 2015. (Poster)

Kairo G, Belzunces LP, Brunet J-L (2015). Défaillance des reines : Peut-elle s'expliquer par une baisse de fertilité des mâles suite à une exposition à un stressor environnemental ? Journées d'étude ANERCEA, Montluçon, France, février 2015. (communication orale)

Kairo G, Belzunces LP, Brunet J-L (2014). Effets des interactions toxicopathologiques sur la qualité du sperme, la fécondité et la durée de vie des reines chez l'abeille domestique. 2^{ème} journées de la recherche apicole, Paris, France, février 2014. (communication orale)

Kairo G, Belzunces LP, Brunet J-L (2013). Effets de l'insecticide fipronil, de la microsporidie *Nosema ceranae* et de leur association sur la qualité du sperme et la physiologie des mâles chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L. Journée Technique de l'ADAPI et du GPGR, Aix-en-Provence, France, décembre 2013. (communication orale)

Kairo G, Belzunces LP, Brunet J-L (2013). Effets de l'insecticide fipronil, de la microsporidie *Nosema ceranae* et de leur association sur la qualité du sperme et la physiologie des mâles chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L. 5^{ème} journée des doctorants du département SPE, Montpellier, France, juin 2013. (communication orale)

Partie 1

Introduction bibliographique

I. Les problèmes de fertilité dans le règne animal

1. Introduction

L'époque contemporaine est le théâtre d'une course à l'innovation et au développement de nouvelles technologies dont un des résultats est la production croissante de nouvelles substances chimiques destinées à des usages variés (industrie, agriculture, consommation courante...). Aujourd'hui, il est estimé que 120 000 substances chimiques différentes sont produites dans l'UE alors que moins de 5% d'entre elles ont fait l'objet d'une évaluation, dans le cadre du règlement européen REACH, dans le but d'évaluer leur dangerosité (ECHA 2016). Les impacts environnementaux liés à l'usage de ces substances font l'objet d'inquiétudes grandissantes concernant les conséquences sur la santé humaine et animale. Entre autres, l'exposition multiple à des substances, qui n'existaient pas il y a quelques décennies, peut engendrer des troubles de la fonction de reproduction. Ces troubles de la fonction de reproduction sont définis, par les autorités de régulation, comme des effets délétères pouvant résulter d'altérations de la fertilité mâle et femelle et d'un développement anormal de la descendance (EC 1991). L'augmentation rapide de ces troubles, constatés chez de nombreuses espèces, ne peut être attribuée à une cause génétique telle que l'apparition de mutations car elle est aussi observée chez des espèces pour lesquelles le temps de génération est relativement élevé, comme pour l'espèce humaine. La cause environnementale due à l'augmentation du nombre et de la concentration des toxiques dans l'environnement est donc la piste privilégiée (Sharpe and Skakkebaek 1993). Cependant, si les polluants environnementaux ont une part de responsabilité importante dans les troubles reproductifs observés, ils ne représentent pas les seules causes de ces troubles. En effet, les agents infectieux touchant le tractus génital des individus masculins et féminins ainsi que les facteurs physiques tels que les agents ionisants, les champs électromagnétiques ou encore la température ont aussi une capacité non négligeable à affecter les fonctions reproductrices. Quelles qu'en soient les causes, les troubles de la reproduction, en perpétuelle augmentation depuis le milieu du XX^{ème} siècle, deviennent peu à peu une préoccupation majeure car ils sont intimement liés au devenir non seulement de l'humanité mais aussi de la faune sauvage (INSERM 2012, Habert et al. 2014).

2. La fertilité humaine

La fertilité humaine est définie comme l'aptitude biologique des couples à obtenir une grossesse aboutissant à une naissance vivante. La stérilité correspond à l'inaptitude biologique à procréer tandis que l'infertilité est caractérisée par la difficulté à concevoir. Aussi, appréhender les troubles de la fertilité masculine et féminine devient un véritable enjeu sociétal (Slama and Leridon 2014).

2.1. L'infertilité

Dans les pays développés où des moyens de contraception sont facilement disponibles, les couples désirent rarement plus de 2 ou 3 enfants. Cependant le nombre d'enfants peut être aussi limité par des problèmes d'infertilité. L'infertilité est définie comme la difficulté à procréer au-delà de 12 mois consécutifs après l'arrêt de la contraception, quand elle était utilisée (Slama and Leridon 2014). Ainsi, un couple sur quatre ne parvient pas à procréer au bout de ces 12 mois (Slama et al. 2012). Selon une étude de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) conduite dans les années 1990, l'infertilité au sein d'un couple peut être d'origine féminine dans 37% des cas, masculine dans 8% des cas et mixte dans 35% des cas. Pour les 20% des cas étudiés restant, soit une grossesse est survenue en cours d'étude, soit la source de l'infertilité ne pouvait être expliquée (WHO 1992).

2.1.1. Infertilité féminine

Les cas d'infertilité féminine peuvent impliquer différentes causes. Les causes de cette infertilité peuvent résulter de dysfonctionnements hormonaux ainsi que de pathologies des tissus essentiels au potentiel reproducteur des femmes. Ainsi, des altérations fonctionnelles de l'axe hypothalamo-hypophysaire, des ovaires, de l'utérus, de l'endomètre ou des glandes mammaires peuvent affecter la fertilité féminine (Olooto et al. 2012, Habert et al. 2014).

2.1.2. Infertilité masculine

La détérioration temporelle de la fertilité masculine a été soulevée, pour la première fois, dans le milieu des années 1970 (Nelson and Bunge 1974). Depuis 1940, la concentration en spermatozoïdes aurait chuté drastiquement dans les pays industrialisés. La concentration en spermatozoïdes serait passée de plus de 100 millions par millilitre de sperme à environ 50 millions (Carlsen et al. 1992, Auger et al. 1995, Sharpe and Irvine 2004, Rolland et al. 2013) (Fig. 1). Cette diminution continue est une préoccupation alarmante du fait qu'en dessous de 40 millions de spermatozoïdes par millilitres, les délais nécessaires pour concevoir commencent à s'allonger. De plus, l'OMS, fixe la limite supérieure de l'oligospermie (concentration en spermatozoïdes anormalement basse) à 15 millions de spermatozoïdes. La probabilité de concevoir devient très faible en dessous de 5 millions et nulle en dessous de 1 million (Habert et al. 2014). Cette baisse de concentration peut être aggravée dans les cas où la viabilité, la mobilité, les structures membranaires et l'ADN des spermatozoïdes sont aussi altérés. Cependant, la baisse de qualité du sperme n'est pas le seul symptôme de l'infertilité masculine. Une augmentation du taux de cancer du testicule, des hypospadias (malformation congénitale correspondant à l'ouverture de l'urètre sur la face inférieure du pénis) et des cryptorchidies (ou ectopies : non descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum) a également été observée ces dernières décennies (Sharpe and Irvine 2004, Slama and Leridon 2014) (Fig. 1).

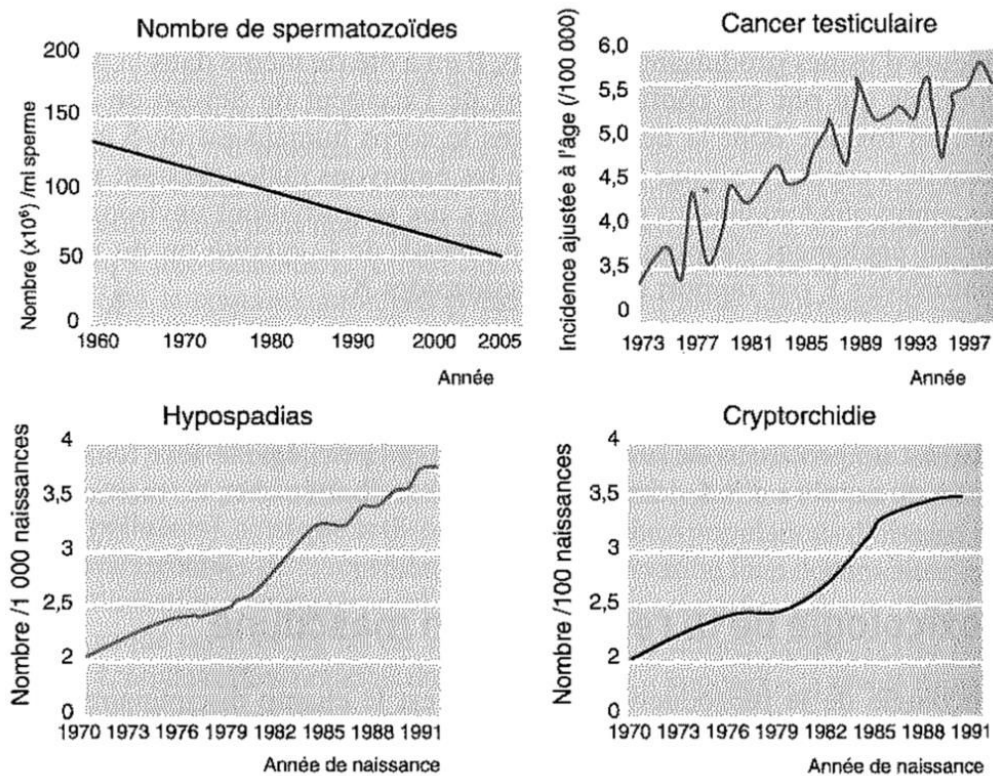


Fig. 1 : Evolution du nombre de spermatozoïdes et des anomalies des organes génitaux externes masculins au cours des dernières décennies en Europe (Auger et al. 1995, Sharpe and Irvine 2004, Rolland et al. 2013).

2.2. Causes de l'infertilité

Les facteurs environnementaux tels que les infections et les substances d'origine anthropique constituent des causes majeures de l'infertilité.

2.2.1. Les agents infectieux

Les agents infectieux, pour la plupart sexuellement transmissibles, ont la capacité d'interférer avec la fonction de reproduction de chacun des sexes. Les bactéries telles que *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* et les virus tels que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), celui de l'herpès (*Herpes simplex virus-2* (HSV-2)), ceux des hépatites B et C, et le papillomavirus, sont des causes d'infertilité importantes (Pellati et al. 2008, INSERM 2012). Les infections de l'appareil génital seraient impliquées pour 15 % dans les cas d'infertilité masculine (Pellati et al. 2008).

2.2.2. Les substances chimiques

Les substances d'origine anthropique sont particulièrement incriminées dans les troubles de la reproduction. Les polluants atmosphériques, les métaux lourds, les pesticides, les polluants organiques persistants, les phtalates, les phénols, les solvants, etc., sont des substances d'origines diverses et omniprésentes dans l'environnement et qui, en conséquence, contaminent quotidiennement les organismes humains et animaux. Ces substances ont la capacité d'altérer la fonction de reproduction soit en affectant directement les tissus et les organes de la reproduction soit par des perturbations du système endocrinien régulant la reproduction (INSERM 2012, Habert et al. 2014). Dans ce dernier cas, ces substances sont appelées « perturbateurs endocriniens reprotoxiques ».

Ainsi, les substances reprotoxiques peuvent avoir des effets directs sur les organes reproducteurs et les gamètes. Parmi ces effets, les xénobiotiques peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène pouvant causer un stress oxydant qui est défini comme un déséquilibre entre les molécules oxydantes et les composés antioxydants des cellules dont les gamètes. Une faible quantité de ces espèces réactives de l'oxygène est nécessaire au phénomène de capacitation des spermatozoïdes qui correspond à leur capacité de fertilisation. Cependant, une quantité trop importante de ces composés oxydants peut engendrer des altérations des membranes plasmiques et de l'ADN des cellules germinales. Ces modifications peuvent ainsi compromettre la génération des gamètes, la capacité à se mouvoir des spermatozoïdes, la fusion des gamètes et induire un processus d'apoptose conduisant à une baisse du nombre de spermatozoïdes associée à l'infertilité masculine (Agarwal et al. 2003).

Une partie des substances reprotoxiques sont des perturbateurs endocriniens. L'OMS a qualifié un perturbateur endocrinien comme étant « une substance exogène ou un mélange qui altère la/les fonctions(s) du système endocrinien et, par voie de conséquence, cause un effet délétère sur la santé d'un individu, sa descendance ou des sous-populations » (WHO 2002). Ces perturbateurs peuvent modifier les concentrations hormonales et/ou avoir une action sur les tissus cibles en rentrant en compétition avec l'hormone endogène ou en altérant les voies métaboliques régulées par les hormones (Habert et al. 2014). Les perturbateurs endocriniens regroupent de nombreux composés chimiques. Parmi les plus connus, il est possible de citer certains plastifiants (phtalates, Bisphénol A (BPA)), des pesticides (organochlorés, e.g. dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)), les produits de combustion (dioxines, hydrocarbures aromatiques polycycliques), des médicaments et

hormones de synthèses ou encore les produits chimiques synthétiques tels que les polychlorobiphényles (PCB). Ces substances sont particulièrement dangereuses, pour beaucoup d'entre-elles, du fait de leurs propriétés volatiles et lipophiles induisant une bioaccumulation importante le long des chaînes trophiques. De plus, les perturbateurs endocriniens peuvent, dans beaucoup de cas, engendrer des effets à faibles doses et/ou induire des effets retardés. Ainsi, une exposition au stade fœtal peut engendrer des troubles à l'âge adulte, comme cela a parfaitement été démontré avec le diéthylstilbestrol (DES) (Laronda et al. 2012). De plus, certains effets peuvent se transmettre sur plusieurs générations par le biais de mécanismes (i) génétiques, impliquant des modifications dans la séquence de l'ADN, ou (ii) épigénétiques, n'induisant pas de modifications de la séquence d'ADN mais des changements structuraux qui se traduisent par des modifications fonctionnelles de l'expression génique (INSERM 2012).

1.3. Effets des facteurs environnementaux sur les populations

Les effets délétères induits par des expositions de populations humaines à des facteurs environnementaux ont pu être mis concrètement en avant par des études épidémiologiques. Une étude conduite en Argentine, entre 1995 et 1998, sur des travailleurs dans une des régions agricoles les plus productives au monde a permis d'établir une corrélation entre la qualité de cet environnement et l'altération de la fertilité masculine (Oliva et al. 2001). De même, une exposition au chlordécone, un insecticide organochloré utilisé dans les bananeraies aux Antilles, a montré des effets reprotoxiques dont une augmentation des cancers de la prostate chez la population indigène (Multigner et al. 2016). Des populations indiennes vivant au bord des grands lacs d'Amérique du nord, près de zones fortement industrialisées, présentaient dans les années 2000, des proportions de moins de 30% de naissances masculines. Un constat similaire a pu être effectué pour la descendance de travailleurs d'usines produisant du plomb et pour des hommes contaminés en 1976, à Seveso en Italie, après l'émission d'un nuage contenant de la dioxine suite à une explosion consécutive à la surchauffe d'un réacteur chimique dans une usine. Un sex-ratio anormal pourrait être expliqué par une sensibilité accrue des embryons mâles ou des spermatozoïdes Y aux facteurs environnementaux (Habert et al. 2014). Parmi les nombreuses études épidémiologiques existantes chez l'homme, celles montrant les effets reprotoxiques des substances chimiques répandus dans notre environnement restent rares.

3. Les troubles de la reproduction animale

Des atteintes de la fonction de reproduction ont également été observées dans les populations animales exposées de façon aiguë ou chronique à des polluants présents dans leur environnement. Un lien entre le déclin des populations animales et les troubles de la reproduction a pu être mis en évidence dès les années 1960.

Dans les années 1960, le pesticide organochloré DDT a ainsi été accusé de contribuer au déclin des populations d'oiseaux (Carson 1962). Dans les années 1980, il a été montré que cette même substance induisait des effets reprotoxiques sur les alligators en Floride se traduisant par une diminution de la taille du pénis et des testicules chez les mâles et des morphologies ovariennes anormales chez les femelles (Guillette and Guillette 1996). Une féminisation des poissons a été observée dans plusieurs régions du monde au sein desquelles il y avait une forte activité industrielle prospère (Sumpter 2002). Au bord du lac Michigan, une baisse de la population des visons d'élevage a été associée à une contamination aux PCB contenus dans les poissons qu'ils consommaient (Hornshaw et al. 1983). Ces quelques exemples d'effets reprotoxiques de polluants ne sont qu'une infime illustration de l'ensemble des altérations de la reproduction induites chez les espèces animales vertébrées. Toutefois, ces affections peuvent également toucher les invertébrés dont les arthropodes. Des exemples d'exposition à des agents infectieux et des substances chimiques ont pu montrer, chez quelques espèces, (i) une modification comportementale dans le choix du partenaire sexuel ou une baisse du succès d'accouplement (Knight and Flexner 2007, McCallum et al. 2013), (ii) une baisse de la fertilité (Bauer and Nordin 1989, Seth et al. 2004, Brennan et al. 2012, Misra et al. 2014), et (iii) des effets sur la production de la descendance se traduisant, chez celle-ci, par des altérations de la viabilité, de la fertilité ou du sex-ratio (Bauer and Nordin 1989, Laycock et al. 2012, Tassou and Schulz 2013, Costa et al. 2014, Pigeault et al. 2015, Xiao et al. 2015). Toutefois, les atteintes des fonctions de la reproduction chez les arthropodes restent pauvrement étudiées. Plus particulièrement, trop peu d'études se sont intéressées aux troubles de la fonction de reproduction chez les insectes pollinisateurs, pour lesquels, un déclin associé à de nombreux facteurs environnementaux est reporté (Biesmeijer et al. 2006, Potts et al. 2010).

II. L'abeille domestique

1. Généralités

1.1. Origine

Les abeilles sont des insectes hyménoptères. L'apparition des abeilles sur terre remonterait à 100 millions d'années, à l'ère du crétacé. Cette apparition est étroitement liée à celle des plantes à fleurs (angiospermes) avec lesquelles une relation mutualiste s'est instaurée. Les abeilles, par leur activité de butinage pour récolter le pollen (apports en protéines, lipides et minéraux) et le nectar (apports en glucides), sont des acteurs majeurs de la pollinisation des fleurs permettant ainsi d'assurer la reproduction sexuée d'une grande partie des végétaux. Au fil des millénaires, la coévolution des plantes à fleurs et des abeilles a contribué à une diversité exceptionnelle des espèces au sein de ces deux groupes. Il existe environ 20 000 espèces d'abeilles dans le monde dont la diversité peut se caractériser par leur morphologie (taille, couleur, longueur de la langue) qui est liée à divers degrés de spécialisation concernant les choix floraux et leur mode de vie (solitaire, grégaire ou social). L'abeille domestique (*Apis mellifera L.*), de la famille des *Apidae* qui est caractérisée par la présence de corbeilles à pollen sur les pattes postérieures, est une espèce pollinisatrice polylectique dite eusociale (Winston 1987). Son nom prend son origine dans sa capacité à produire et stocker une grande quantité de miel. C'est d'ailleurs, une des vertus qui lui a valu, depuis près de 9000 ans, d'être utilisée par l'homme comme animal de production (Roffet-Salque et al. 2015). Naturellement, cette espèce couvre une zone géographique rassemblant l'Europe, l'Afrique et le Moyen orient. La variété d'habitats, de conditions climatiques et de flores, de cette vaste zone géographique, est à l'origine de plusieurs sous-espèces (races) présentant chacune des caractéristiques propres du fait de leur adaptation à l'environnement de leur région (Fig. 2). Cependant, les pratiques apicoles résultant du déplacement des abeilles à travers le monde et de la sélection, en vue d'obtenir des caractéristiques de production intéressantes, ont considérablement modifié les aires de répartition des différentes races et ont été accompagnées d'une forte hybridation de ces dernières.



Fig. 2 : Localisation des différentes sous-espèces d'*Apis mellifera* et extension orientale de l'espèce *Apis cerana* (Winston 1987)

1.2. Importance de l'abeille domestique

De par son activité de butinage et le service de pollinisation des plantes à reproduction entomophiles qu'elle effectue, l'abeille domestique a un rôle écologique mais également une importance agronomique et économique pour l'homme. En 2010, suite à un audit économique de la filière apicole française, la valeur économique des produits et services de l'apiculture a été estimée à plus de 130 millions d'euros (Fig. 3) (FranceAgriMer 2012). De plus, cette activité de butinage dans un rayon de plusieurs kilomètres autour de la ruche, et l'exposition aux polluants environnementaux qui en résulte, confère à l'abeille un rôle de bioindicateur de haute sensibilité de la qualité de l'environnement. Ainsi, *Apis mellifera* peut être utilisée comme indicateur par (i) la présence de résidus dans les produits de la ruche et les abeilles, (ii) un suivi de l'évolution de ses populations et (iii) l'étude de la modulation de biomarqueurs qui sont définis comme des changements observables ou mesurables au niveau moléculaire, cellulaire, physiologique ou comportemental pouvant révéler une exposition des organismes aux polluants présents dans l'environnement (Bogdanov 2006, Badiou-Beneteau et al. 2013, Carvalho et al. 2013, Barganska et al. 2016, Wegener et al. 2016). Ainsi, l'abeille domestique apparaît comme un insecte d'intérêt dont la biologie et les causes du déclin sont largement étudiées.

Produits ou prestation	Montant estimé en €	en %
miel	1 15 155 000	86,2
pollen	1 709 000	1,3
propolis	438 000	0,3
gelée royale	3 563 000	2,7
cire	311 000	0,2
produits de la ruche	121 176 000	90,7
pain d'épices	1 478 000	1,1
nougat	525 000	0,4
divers	2 110 000	1,6
produits transformés	4 113 000	3,1
essaims	4 144 000	3,1
reines	1 065 000	0,8
produits de l'élevage	5 209 000	3,9
pollinisation	3 048 000	2,3
chiffre d'affaires total	133 546 000	100,0

Source : PROTEIS

Fig 3 : Valeur économique des « produits et services » de l'apiculture française en 2010 (FranceAgriMer 2012)

1.3. Une espèce en déclin

Un déclin global des insectes pollinisateurs, dont l'abeille mellifère, a été observé ces dernières décennies. Celui-ci peut se traduire par des déclin et des extinctions de populations locales voire totales (Neumann and Carreck 2010, Potts et al. 2010, Nieto et al. 2014, Goulson et al. 2015). Les colonies d'abeilles domestiques sont confrontées à un phénomène de surmortalité dans l'hémisphère nord pouvant se traduire par des pertes annuelles de plus de 50% (Neumann and Carreck 2010, Seitz et al. 2016) (Fig. 4). Les premiers cas de surmortalités furent décrits dès 1975 après le constat de nombreuses pertes de colonies dans 27 états des USA. Ce mal mystérieux fut nommé, à l'époque, « maladie de disparition des abeilles » (Wilson and Menapace 1979). Dans les années 2000, ce phénomène fut de nouveau observé et était associé à une disparition massive et brutale des ouvrières de la ruche malgré l'abondance de couvain et de réserves de nourriture. Il fut nommé CCD (Colony Collapse Disorder) ou syndrome d'effondrement des colonies. Dans les colonies victimes du CCD, il ne reste que la reine entourée de quelques abeilles en nombre insuffisant pour assurer les tâches nécessaires au maintien de la colonie (Oldroyd 2007, Neumann and Carreck 2010). Les raisons de l'effondrement des colonies d'abeilles ont fait l'objet d'intenses recherches ces dernières années. Ces recherches semblent incriminer de nombreuses causes telles que (i) les nosémoses, infections fongiques

provoquant des diarrhées et/ou un stress énergétique, (ii) l'ectoparasite *Varroa destructor* qui, en se nourrissant de l'hémolymphe des abeilles, contribue à leur affaiblissement et à la propagation de nombreux virus tels que le virus de paralysie aiguë (IAPV : *Israeli Acute Paralysis Virus*) et le virus des ailes déformées (DWV : *Deformed Wing Virus*), (iii) les activités humaines qui se traduisent par la perte ou la modification d'habitats, des carences alimentaires liées aux monocultures et l'utilisation des pesticides dont certains insecticides systémiques (néonicotinoïdes et phénylpyrazoles) et (iv) les variations climatiques. Même si chacun de ces facteurs a la capacité d'induire des mortalités importantes d'abeilles, l'association de plusieurs facteurs reste la piste privilégiée pour expliquer les disparitions importantes de colonies (Oldroyd 2007, Neumann and Carreck 2010, vanEngelsdorp and Meixner 2010, Goulson et al. 2015). Entre autres, il s'est avéré que diverses combinaisons de ces facteurs pouvaient induire des effets synergiques engendrant des taux de mortalité beaucoup plus importants que ceux induits par les facteurs pris séparément. L'association insecticide/fongicide (Deltaméthrine + Prochloraze) (Colin and Belzunces 1992), ou diverses associations insecticide/parasite (*Nosema ceranae* + Imidaclopride ou Thiaclopride ou Fipronil) en sont des exemples illustratifs (Alaux et al. 2010, Vidau et al. 2011, Aufauvre et al. 2012). De plus, dans les interactions toxico-pathologiques, le pathogène peut sensibiliser les abeilles à une exposition ultérieure au pesticide et réciproquement (Aufauvre et al. 2012). Cependant, si les effets létaux et les effets sublétaux tels que les altérations des fonctions motrices, cognitives, immunitaires et métaboliques ont été largement investigués chez les ouvrières (Desneux et al. 2007, Higes et al. 2010, Neumann and Carreck 2010, vanEngelsdorp and Meixner 2010, Pisa et al. 2015), très peu d'études se sont intéressées aux effets des différents stressseurs et leur combinaison sur les individus reproducteurs de la colonie (reines et faux-bourçons) et la fonction de reproduction.

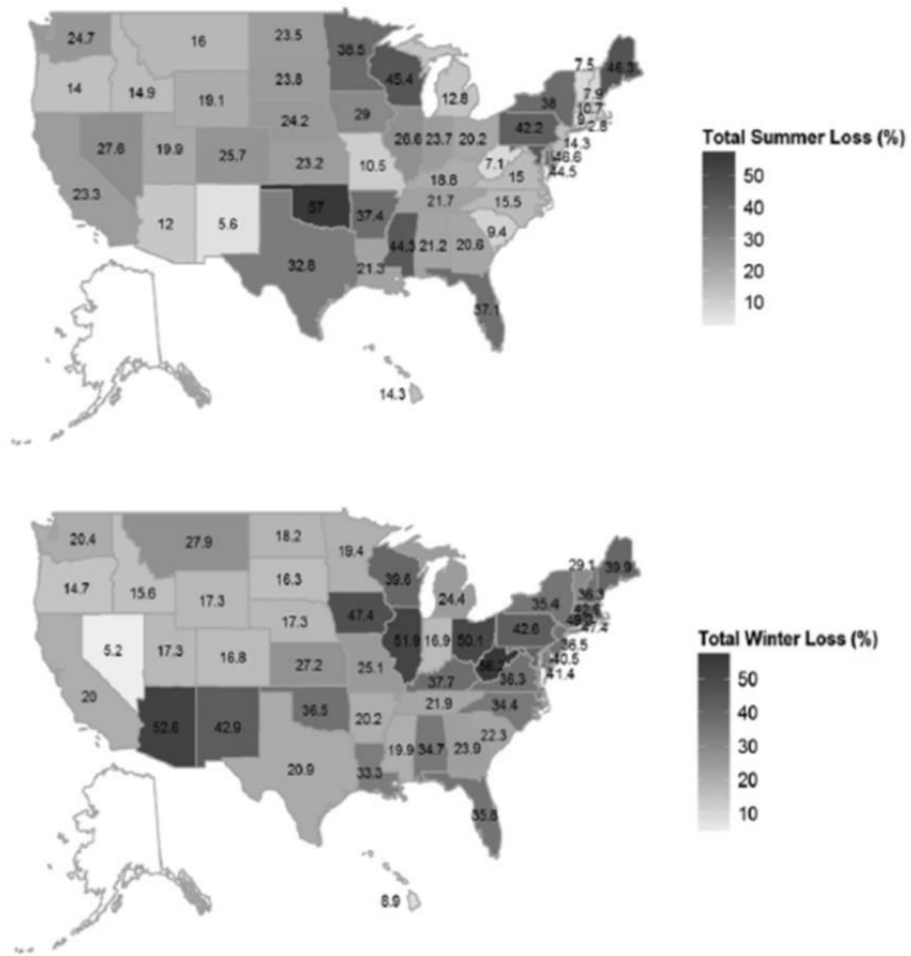


Fig. 4 : Résultat de l'enquête 2014-2015 sur les pertes annuelles de colonies d'abeilles aux Etats Unis (Seitz et al. 2016)

2. Biologie de l'abeille domestique

2.1. Les différentes castes

Une colonie d'abeilles domestiques est constituée de plusieurs dizaines de milliers d'individus et présente une organisation complexe avec différentes castes : la reine, les faux-bourdon et les ouvrières (Fig. 5). Tous les individus passent par différents stades : œufs, larves, pupes et adultes. Les stades immatures (œufs, larves et pupes) constituent le couvain dont la durée de développement varie selon la caste : 21 jours pour l'ouvrière, 16 jours pour la reine et 24 jours pour le faux-bourdon. L'ouvrière et la reine sont issues d'œufs fertilisés (individus diploïdes). La distinction entre reine et ouvrière se fait essentiellement par l'alimentation reçue lors du développement et, dans une moindre mesure, par la taille de la cellule dans laquelle ces individus sont élevés. La larve destinée à devenir une future reine est nourrie à la gelée royale alors que l'ouvrière reçoit de la gelée nourricière. Le faux-bourdon se distingue par son caractère haploïde. Il est issu d'un œuf non fertilisé pondu dans une alvéole plus large (Winston 1987). Chacune de ces castes a des fonctions qui lui sont propres. La reine, seule femelle reproductrice, s'accouple au début de sa vie et peut avoir une durée de vie de plusieurs années. Elle rythme la vie de sa colonie par les phéromones qu'elle produit et en assure la pérennité en pondant jusqu'à 2000 œufs par jour lorsque les conditions sont favorables (Winston 1987). Les faux-bourdon, reproducteurs mâles, sont produits du printemps à la fin de l'été pour féconder les reines vierges des autres colonies. Ils permettent ainsi la propagation des gènes de leur colonie. Ils peuvent avoir une durée de vie de 2 mois et représentent plusieurs centaines d'individus au sein de la colonie. Ils sont chassés ou tués lorsque les conditions deviennent défavorables au maintien ou au développement de la colonie (Winston 1987, Boes 2010). Les ouvrières, individus femelles ayant des organes reproducteurs atrophiés, constituent la grande majorité des individus de la colonie. Elles assurent les différentes tâches de la colonie principalement associées à leur changement de physiologie en fonction l'âge. Ainsi, les jeunes abeilles occupent les tâches de construction, de nettoyage, d'entretien et d'alimentation du couvain alors que les abeilles plus âgées s'occupent des tâches extérieures de défense du nid et de récolte des ressources nécessaires à leur survie (nectar, pollen, propolis et eau) dans un rayon pouvant aller jusqu'à 10 km autour de la colonie (Steffan-Dewenter and Kuhn 2003). Elles vivent autour de 6 semaines au printemps et en été et jusqu'à plusieurs mois lorsque la colonie hiverne (Winston 1987, Page and Peng 2001).

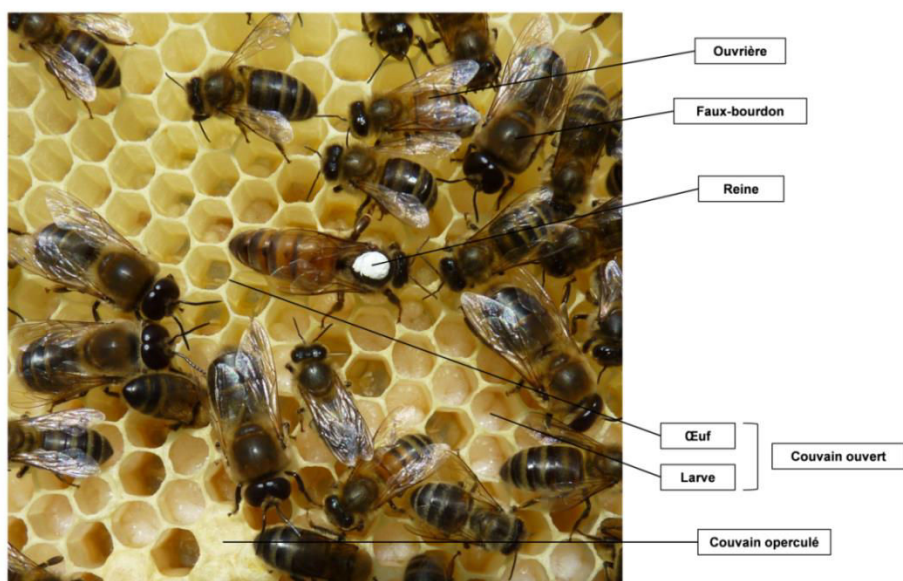


Fig. 5 : Les différentes castes de la colonie sur un cadre de couvain (Photo : Y. Poquet)

2.2. Le cycle biologique

A la sortie de l'hiver, lorsque les conditions deviennent favorables, la colonie d'abeilles s'active. Les ouvrières accumulent des réserves, la reine recommence à pondre et la colonie se développe. A cette période, les faux-bourdons font également leur réapparition. Lorsque les colonies deviennent trop peuplées suite à la forte croissance de la population d'ouvrières, de nouvelles reines sont élevées. L'ancienne reine s'envole alors avec la moitié de ses ouvrières, lors du processus d'essaimage, pour aller fonder une autre colonie. Au sein de la colonie initiale, une nouvelle reine émerge avant de réaliser ses vols de fécondation aux alentours du 10^{ème} jour de sa vie et prendre sa place de matriarche. Ainsi, le processus d'essaimage peut ainsi être considéré comme le mode de reproduction de ce super organisme qu'est la colonie d'abeille. Les deux colonies issues de la scission de la colonie mère poursuivent leur développement jusqu'à l'arrivée de l'hiver qu'elles appréhenderont avec une baisse graduelle de leur population suite à un ralentissement de l'activité de ponte de la reine et en puisant dans les réserves engrangées à la belle saison. Il faut préciser que le processus d'essaimage n'est pas le seul déclencheur de l'élevage de reines. Celui-ci est également engagé lorsque la colonie renouvelle sa reine moins performante ou trop âgée par supersédure (Winston 1987, Seeley et al. 2006).

2.3. La reproduction sexuée

2.3.1. Un mode de reproduction singulier : la polyandrie

L'abeille mellifère a un mode de reproduction singulier dit polyandrique. La jeune reine s'accouple avec de nombreux mâles dont elle conserve les semences dans un organe de stockage, la spermathèque. Une partie des semences de tous les faux-bourçons avec lesquels la reine copule est stockée dans la spermathèque même si tous les mâles ne contribuent pas de façon égale à la production de la descendance (Laidlaw and Page 1984, Moritz 1986, Haberl and Tautz 1998, Kraus et al. 2003). En effet, si l'ordre des copulations n'influence pas la fréquence de la descendance, ne laissant aucun avantage au premier ou dernier mâle (Schluns et al. 2005), le volume d'éjaculat semble l'influencer (Schluns et al. 2004). Ainsi, les faux-bourçons plus gros, produisant une plus grande quantité de semence, seraient d'avantage représentés dans la descendance (Schluns et al. 2003, Schluns et al. 2004). De plus, certaines colonies produisent des mâles avec un succès reproducteur plus important que d'autres colonies (Kraus et al. 2003). Ces mâles vont également engendrer une plus forte proportion de descendance (Kraus et al. 2003). De ce fait, bien que le cycle de vie d'une colonie est femelle-centré, le succès reproducteur des mâles semble être le principal moteur de la sélection naturelle chez l'abeille mellifère (Kraus et al. 2003). Ainsi, la diversité du sperme stocké, issue de la sélection naturelle, permet une diversité génétique intra-coloniale élevée. Cette diversité génétique au sein d'une colonie a pour résultats une meilleure adaptabilité aux variations environnementales, une meilleure productivité ainsi qu'une meilleure résilience face aux stress (Baer and Schmid-Hempel 1999, Tarpy and Page 2002, Tarpy 2003, Mattila and Seeley 2007, Oldroyd and Fewell 2008). Cependant, bien que présentant de nombreux bénéfices, la polyandrie peut avoir un coût non négligeable. En effet, les vols de fécondation augmentent le risque de prédation et nécessitent une dépense énergétique importante pour la reine (Baer and Schmid-Hempel 1999, Hosken and Stockley 2003). Les accouplements successifs peuvent également engendrer un risque de blessure pour cette dernière et l'exposent d'avantage au risque de contracter une infection sexuellement transmissible (Hosken and Stockley 2003, Yue et al. 2007, Roberts et al. 2015).

2.3.2. Les reproducteurs

2.3.2.1. *Le faux-bourdon : anatomie et développement*

Le faux-bourdon, plus gros qu'une ouvrière, est caractérisé morphologiquement par des yeux et un thorax très développés qui lui donnent de bonnes aptitudes de vol et d'orientation (Fig. 5). Il a aussi pour particularité d'être dépourvu de dard et d'avoir un appareil reproducteur qui occupe une grande partie de son abdomen (Fig. 6). Les organes reproducteurs comprennent une paire de testicules reliés chacun à une vésicule séminale par un canal déférent. Les vésicules séminales sont, chacune attachées à la partie apicale d'une glandes à mucus, elle-même reliée par un canal éjaculateur fixé au bulbe de l'endophallus (Fig. 6) (Dade 1994).

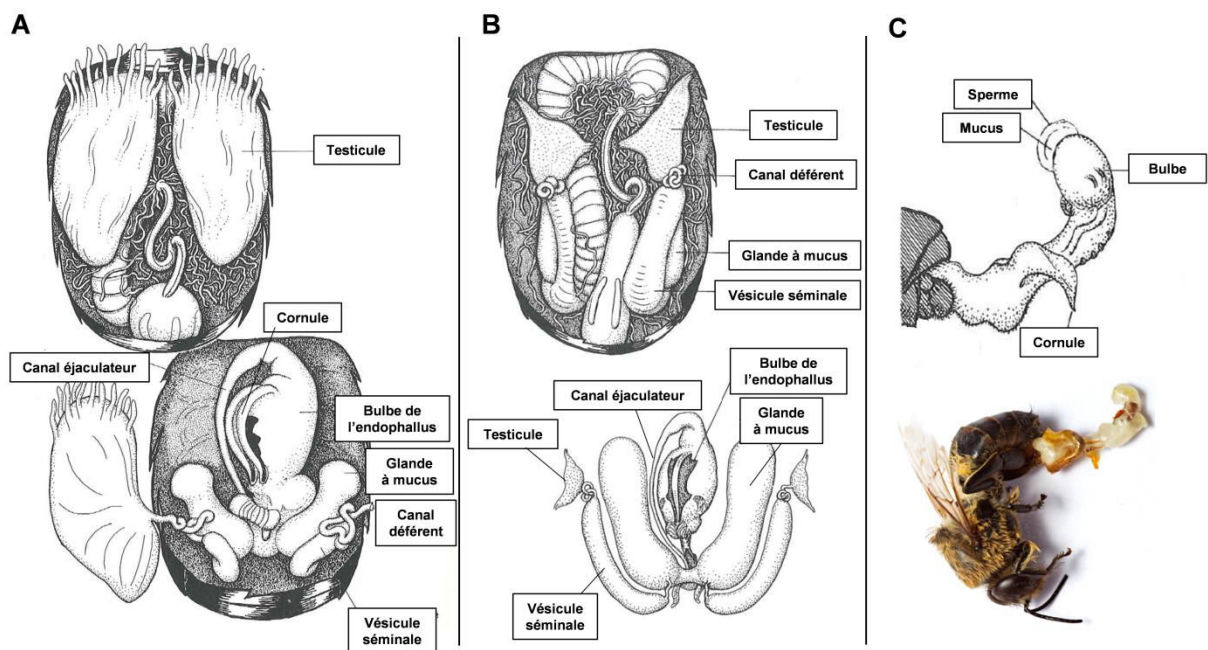


Fig. 6 : Les organes reproducteurs du faux-bourdon. (A) Appareil reproducteur d'un individu émergent (spermatozoïdes n'ayant pas encore migré des testicules vers les vésicules séminales) ; (B) Appareil reproducteur d'un individu âgé d'au moins 5 jours (testicules atrophiés et vésicules séminales remplies de spermatozoïdes) ; et (C) Eversion de l'endophallus et éjaculation d'un mâle sexuellement mature (Dade 1994).

Le temps de développement d'un faux-bourdon de l'œuf à l'émergence de l'adulte est de 24 jours (3 jours au stade œufs ; 6,5 jours au stade larvaire ; et 14,5 jours au stade nymphal) (Page and Peng 2001). Les faux-bourdons sont prospermatogéniques : le développement des testicules et la spermatogenèse démarrent à la fin du stade larvaire pour s'achever avant l'émergence de l'adulte. Cependant, la maturité sexuelle, qui peut être définie comme la capacité à éjaculer du sperme, semble atteinte qu'à partir de 12 jours pour les mâles les plus précoces (Ruttner 1968). Au stade larvaire, les testicules sont composés de 200 tubes séminifères qui contiennent les spermatogonies. La spermatogenèse va commencer 10 jours après la ponte, dès le stade nymphal. Chez la jeune nymphe mâle, les spermatocytes vont s'accroître par mitoses successives pour former les spermatides. Chez la nymphe de 3 jours, la transformation en spermatides est presque totalement achevée et commence alors le processus de spermiogénèse. A cette étape, la spermatide s'étire et le flagelle se forme pour aboutir au spermatozoïde composé d'un long flagelle de 250 μm environ et d'une toute petite tête ($< 10 \mu\text{m}$). A l'éclosion du faux-bourdon, les spermatozoïdes, entièrement formés, vont entamer une migration des testicules vers les vésicules séminales via le canal déférent. Les testicules, de 5 à 6 mm de diamètre chez le mâle nouveau-né (Fig. 6A), vont s'atrophier au profit des vésicules séminales qui seront complètement remplies entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour après imago (Fig. 6B). Cependant, à cet âge, le faux-bourdon n'est pas prêt à se reproduire. Les spermatozoïdes et tout l'organisme doivent encore subir un processus de maturation physiologique où les glandes du tractus génital jouent un rôle essentiel. Les spermatozoïdes vont ainsi se retrouver orientés la tête piquée dans l'épithélium sécréteur et la queue dans la lumière des vésicules jusqu'entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour de leur vie. A ce moment, les spermatozoïdes, au repos jusque-là, se détachent plus facilement de leur point d'ancrage et leur activité augmente. Les mâles ont alors atteint leur maturité sexuelle (Ruttner 1968).

Au moment de l'accouplement, une évagination de l'endophallus se produit conduisant à une externalisation de la paroi interne (Fig. 6C). Les vésicules séminales se contractent et compriment le sperme dans la partie apicale des glandes à mucus. A l'éjaculation, la membrane de clôture se rompt et le sperme est propulsé dans le canal éjaculateur suivi du mucus protecteur (Ruttner 1968). Un faux-bourdon éjacule de 0,5 à 1,75 μl de sperme, constitué des spermatozoïdes et du liquide séminal. Le sperme contient une concentration de 7 à 10 millions de spermatozoïdes par microlitre (Ruttner 1968, Verma and Shuel 1973, Collins and Pettis 2001).

2.3.2.2. La reine : anatomie et développement

La reine, seule femelle fertile de la colonie se distingue des ouvrières par un abdomen surdéveloppé qui renferme l'appareil reproducteur. La paire d'ovaires occupent la majorité de l'espace de cet appareil. Ils sont chacun constitués de 150 à 180 filaments appelés ovarioles dans lesquels sont produits continuellement les œufs tout au long de la vie de la reine. La partie antérieure des ovaires est constituée de filaments attachés ensemble. Les ovarioles, qui se forment à partir de ces filaments, s'élargissent progressivement jusqu'à la partie postérieure de l'ovaire qui s'ouvre sur un oviducte latéral. Les deux oviductes latéraux se rejoignent pour former l'oviducte médian séparé du vagin par la valve vaginale. Au niveau de la valve vaginale, un canal relie le vagin à la spermathèque qui est l'organe de stockage des spermatozoïdes. La spermathèque, d'un volume moyen de 1 mm^3 , est constituée d'un système de trachées et est surmontée par la glande spermathéciale dont l'un des rôles est de produire le liquide indispensable à la conservation du sperme. Un organe musculéux constitué par une pompe et la valve spermathéciale régule la libération des spermatozoïdes pour fertiliser les œufs avant la ponte (Fig. 7) (Dade 1994).

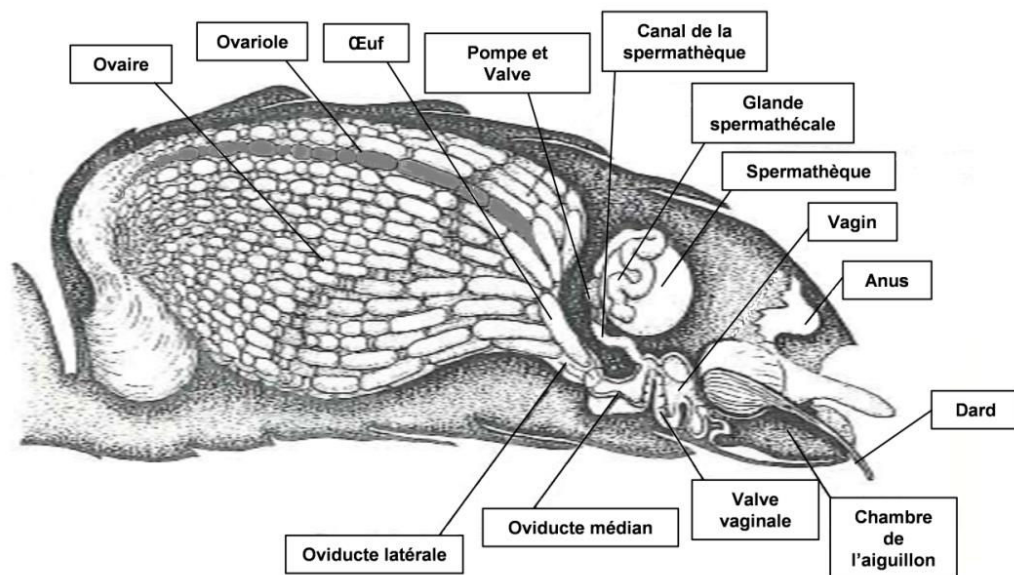


Fig. 7 : Les organes reproducteurs de la reine (Dade 1994).

Le temps de développement d'une reine de l'œuf à l'émergence de l'adulte est de 16 jours (3 jours au stade œufs, 6 jours au stade larvaire et 7 jours au stade nymphal). Si les organes reproducteurs se développent au stade nymphal, la reine n'est pas pour autant sexuellement mature à la naissance. La maturité sexuelle est atteinte 5 à 6 jours après l'émergence. Ce délai correspond à la durée de maturation des glandes mandibulaires qui produisent les phéromones royales, indispensables au maintien de l'organisation sociale de la colonie. A partir de ce moment, la reine subit un harcèlement d'une intensité croissante de la part des ouvrières pour la pousser hors de la colonie afin qu'elle effectue ses vols de fécondation. Ceux-ci réalisés, la reine rentre à sa colonie où l'attend une vie de ponte pour plusieurs années, dans le meilleur des cas. En effet, sa longévité au sein de la colonie est étroitement liée à sa capacité à maintenir son influence sur la colonie et pondre des œufs fertilisés. Sa capacité à produire des œufs n'étant pas limitante, les facteurs limitant de l'activité de ponte sont la quantité et la qualité du sperme stocké lors des vols de fécondation (Harbo 1979, Szabo and Heikel 1987, Winston 1987, Page and Peng 2001, Lodesani et al. 2004). En l'absence de spermatozoïdes disponibles, la reine pondra des œufs non fécondés haploïdes qui donneront à terme des mâles qui iront disséminer le patrimoine génétique de leur mère lors de l'accouplement.

2.3.3. L'accouplement

lorsqu'elle atteint sa maturité sexuelle aux alentours du 10^{ème} jour de sa vie, la reine sort de sa colonie pour s'accoupler avec une vingtaine de mâles au maximum lors de 1 à 3 vols de fécondation (Woyke 1962, Tarpy et al. 2012). Le nombre de vols nuptiaux d'une reine est lié à l'acquisition d'un nombre suffisant de spermatozoïdes pour remplir la spermathèque (Woyke 1962, Schluns et al. 2005). Un vol nuptial a une durée estimée de 5 à 30 min (Koeniger 1986). Les accouplements successifs s'effectuent dans des zones précises nommées aires de congrégation des mâles dans lesquelles se concentrent plusieurs milliers de faux-bourçons pouvant être issus de plusieurs centaines de colonies (Baudry et al. 1998). Après avoir parcouru jusqu'à 5 km pour atteindre ces aires, la reine est poursuivie par plusieurs centaines de mâles attirés par ses phéromones royales, principalement l'acide 9-oxo-2-décénoïque (9-ODA), et les mouvements qu'elle produit (Koeniger 1986). Les copulations successives, de quelques secondes chacune, s'effectuent par éversion de l'endophallus (organe génital mâle) dans la chambre de l'aiguillon de la

reine. L'éversion complète est favorisée par les mouvements de l'abdomen de la reine qui propulsent le sperme dans les oviductes latéraux. La séparation avec la reine a pour conséquence l'éclatement de l'appareil génital du mâle, synonyme de mort pour ce dernier qui tombe au sol alors que la reine poursuivra son ballet avec un nouvel élu (Fig. 8). A l'issue d'un vol de fécondation, les oviductes contiennent 90 millions de spermatozoïdes dont seulement une infime partie sera conservée. A l'issue de l'ensemble de ces vols, 4 à 7 millions de spermatozoïdes migrent vers la spermathèque dans laquelle ils seront conservés en attendant d'être utilisés. Suite à ces accouplements, la reine pondra toute sa vie (1 à 3 ans) et ne retournera plus se faire féconder (Roberts and Mackensen 1951, Woyke 1962, Koeniger 1986).

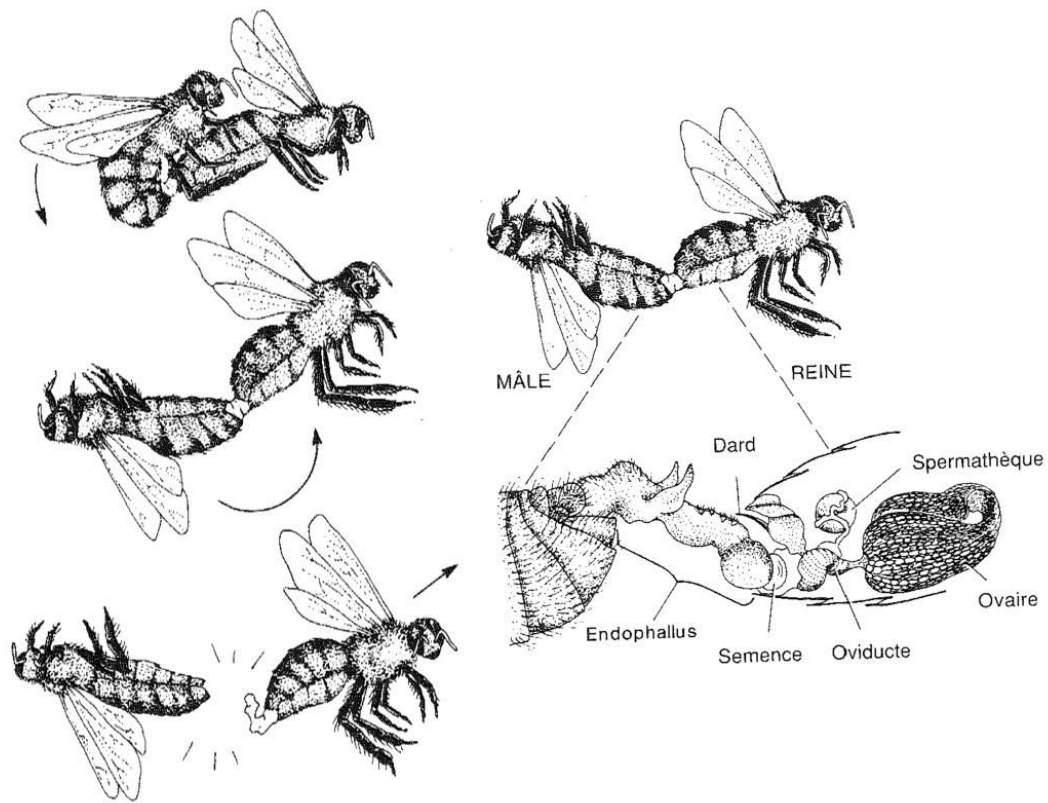


Fig. 8 : Schéma d'un accouplement entre la reine et un faux-bourdon (Winston 1987).

2.3.4. Migration des spermatozoïdes vers la spermathèque

Au moment des copulations successives des faux-bourçons avec la reine, les spermatozoïdes des différents mâles sont propulsés dans les oviductes latéraux dans lesquels un mélange commence à s'opérer. A ce niveau, il n'y a aucune concurrence simultanée ou incapacitation entre les différents éjaculats pour accéder à la spermathèque (Franck et al. 2002, Shafir et al. 2009). La migration des spermatozoïdes peut durer jusqu'à 48 h, bien que la majorité d'entre eux migrent en 4 h et semble favorisée par l'abondance des ouvrières autour de la reine (Woyke 1979, Woyke and Jasinski 1980, Woyke 1983). Cette migration est le fruit de contractions musculaires de l'abdomen, permettant un déplacement passif du sperme, et de mouvements actifs des spermatozoïdes qui sont attirés par les sécrétions glandulaires de la spermathèque (chimiotaxie) (Ruttner and Koeniger 1971, Gessner and Ruttner 1977, Tofilski 2014). Ces mécanismes de transfert aboutissent au stockage des meilleurs spermatozoïdes et l'exclusion de ceux qui sont morts (Ruttner and Koeniger 1971, Gessner and Ruttner 1977, Collins 2000, Gencer and Kahya 2011). Au sein de la spermathèque, les spermatozoïdes des différents mâles vont achever de se mélanger les uns aux autres et sont conservés dans un état inactif en attendant d'être utilisés pour fertiliser les œufs (Laidlaw and Page 1984, Haberl and Tautz 1998, Franck et al. 1999).

2.3.5. Détermination du sexe

2.3.5.1. *Fertilisation des œufs*

Après avoir stocké une quantité de semence suffisante suite à ses vols de fécondation, la reine démarre son activité de ponte. Elle dépose dans les alvéoles de sa colonie jusqu'à 200 000 œufs par an (Winston 1987). Les femelles sont issues d'un œuf fertilisé par un spermatozoïde alors que les mâles sont la conséquence du développement d'un œuf non fertilisé selon un mode de reproduction appelé parthénogénèse arrhénotoque. La reine a la capacité de contrôler la fertilisation des œufs pour produire des mâles ou des ouvrières (Ratnieks and Keller 1998). La fertilisation d'un œuf est le résultat de la libération, par la pompe spermathécale, d'un faible volume de liquide contenant 1 à 10 spermatozoïdes. Ces spermatozoïdes sont déposés sur le micropyle de l'œuf qui est retenu dans l'oviducte par la valve vaginale avant que celui-ci ne soit déposé au fond d'une alvéole (Yu and Omholt 1999, Baer et al. 2016).

2.3.5.2. Détermination génétique du sexe

D'un point de vue génétique, la détermination du sexe chez l'abeille est due à un gène possédant 6 à 18 allèles. Chez les individus diploïdes (femelles), les chromosomes de la même paire possèdent un allèle différent de ce gène. Les femelles sont donc hétérozygotes. L'œuf n'ayant pas subi de fécondation (haploïde) ne détient qu'un allèle et donne obligatoirement un mâle. Il peut arriver qu'un œuf diploïde possède les 2 mêmes allèles, cet œuf donnera un mâle diploïde mais ce mâle reconnu à l'état larvaire par les ouvrières est obligatoirement éliminé. Ce cas de figure se rencontre dans les cas de consanguinité. Lorsque un mâle qui, de par son haploïdie, produit des spermatozoïdes tous identiques à son propre code génétique, féconde une jeune reine qui a un allèle semblable au sien, la moitié de leur descendance donnera alors des mâles diploïdes détruits au stade larvaire. Il est évident que cette situation est un désavantage pour la colonie qui présentera une production moins importante de couvain d'abeilles. Ces cas de consanguinité sont naturellement limités par la polyandrie (Woyke 1986, Tarpy and Page 2002).

2.3.6. Les spermatozoïdes

2.3.6.1. Structure et motilité

Les spermatozoïdes, produits par les testicules, sont de longs filaments de 250 μm de longueur et 0,65 μm de large, comprenant une tête et un flagelle (Fig. 9A). La tête, d'une longueur de 10 μm , contient le noyau de 5,3 μm de long et présente à son extrémité un acrosome, de 3,5 μm de long, très riche en enzymes (Fig. 9B). La fonction de l'acrosome est de permettre la fusion des membranes cytoplasmiques du spermatozoïde et de l'ovocyte (réaction acrosomique) suite à la reconnaissance des deux gamètes. Le flagelle, de forme cylindrique, représente le reste du spermatozoïde et permet ses déplacements. Il est principalement constitué de plusieurs structures allongées : 2 dérivés mitochondriaux et l'axonème (Fig. 9C). Les dérivés mitochondriaux, usines à énergie de la cellule, sont situés de manière excentrée dans le flagelle et commencent dans la région du cône du noyau pour s'étendre le long du flagelle sans toutefois parvenir à son extrémité. Ils fournissent la majeure partie de l'ATP nécessaire à la motilité des spermatozoïdes employant les voies métaboliques de la glycolyse et du cycle de Krebs comme système générateur d'énergie (Blum and Taber 1965, Collins et al. 2006, Al-Lawati et al. 2009). L'axonème, partie

axiale et motrice du flagelle, est accolée aux dérivés mitochondriaux. L'axonème est constitué de 9 doublets de microtubules sur sa périphérie et d'un doublet en position centrale (Fig. 9D) (Lensky et al. 1979, Woyke 1984, Da Cruz-Landim 2009). Les doublets en périphérie sont associés entre eux par des bras de dynéïne qui sont de véritables moteurs moléculaires. L'activation et l'inactivation des bras de dynéïne s'effectue de façon asynchrone par un processus de phosphorylation/déphosphorylation du coenzyme ADP/ATP et entraîne des mouvements ondulatoires de l'axonème (Al-Lawati et al. 2009). Les spermatozoïdes d'abeilles peuvent se trouver dans différents états de mobilité. Leur activation et inactivation peuvent être réversibles selon le pH et l'osmolarité du milieu dans lequel ils se trouvent (Lensky and Schindler 1967, Verma 1978).

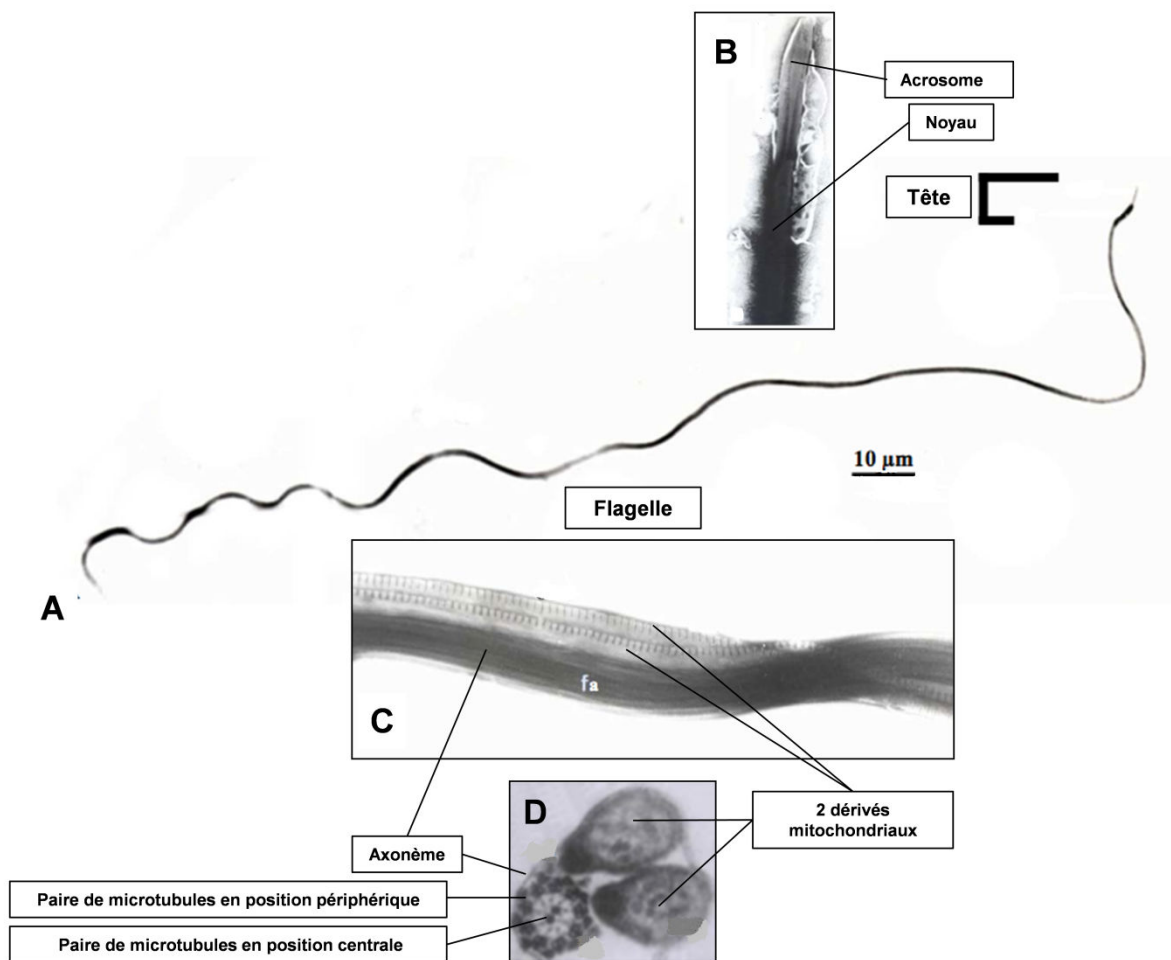


Fig. 9 : Structure d'un spermatozoïde d'*Apis mellifera* L. (A) Spermatozoïde ; (B) Tête ; (C) Flagelle ; (D) Coupe transversale du flagelle (Da Cruz-Landim 2009).

2.3.6.2. *Conservation et métabolisme.*

Dans la période de temps qui s'étend de leur production dans les testicules jusqu'à la fertilisation des œufs qui précède la ponte, les spermatozoïdes subissent différents changements de milieu accompagnés de changements d'état physiologique.

A la naissance, les spermatozoïdes formés migrent des testicules vers les vésicules séminales à l'intérieur desquelles ils sont conservés jusqu'à l'éjaculation. A ce stade, ils baignent dans le liquide séminal nourricier et protecteur. Ce liquide est riche en sucres (glucose, fructose, sucrose et tréhalose), acides aminés et phospholipides qui fournissent la source d'énergie (Alumot et al. 1969, Verma and Shuel 1973, Verma 1978), et en protéines impliquées dans le maintien d'un environnement optimal pour la survie cellulaire (métabolisme et locomotion, conservation à long terme, élimination des déchets cellulaires, protection de l'ADN, défenses antimicrobiennes et anti oxydantes) (Verma 1981, Weirich et al. 2002, Collins et al. 2006, Baer et al. 2009, King et al. 2011, Zareie et al. 2013).

Si les spermatozoïdes sont dans un état particulièrement actif dans les vésicules séminales des mâles et dans le tractus génital de la reine, ils diminuent leur métabolisme pour passer dans un état de conservation dans la spermathèque qui se traduit par un état d'immobilité et d'enroulement. Ce changement d'état est lié à des propriétés différentes entre le liquide séminal et le liquide spermathécal dont la glande spermathécale est la principale contributrice au niveau protéique. Si le rôle du liquide spermathécal ne diffère pas de celui du liquide séminal en ce qui concerne l'objectif de maintenir l'intégrité des spermatozoïdes, ces deux milieux n'ont en commun que 20% de leur profil protéique (Baer et al. 2009). De plus, le liquide spermathécal est un milieu riche en cations sodium et potassium et de pH plus basique. Ces différences auraient pour conséquence un ralentissement du métabolisme énergétique permettant la conservation à long terme des spermatozoïdes. Une diminution de la pression osmotique et du pH du milieu permet leur réactivation, comme cela est observé dans les spermathèques des vieilles reines ou lorsque les spermatozoïdes entrent en contact avec les sécrétions de la glande spermathécale à pH 7 au moment de leur utilisation pour fertiliser l'œuf (Lensky and Schindler 1967, Verma and Shuel 1973, Gessner and Gessner 1976, Al-Lawati et al. 2009).

2.3.6.3. *Evaluation de la qualité du sperme*

La qualité du sperme produit par les faux-bourçons et stocké par les reines peut être déterminée par plusieurs indicateurs. Chez les mâles, les analyses des semences sont possibles après dissection des vésicules séminales (Schluns et al. 2003), ou après éversion manuelle suivi d'un rinçage de l'endophallus (Kaftanoglu and Peng 1984) ou la collecte dans un capillaire selon des techniques couramment utilisées lors de l'insémination instrumentale de reine (Cobey et al. 2013). Chez la reine, les analyses sont possibles après dissection et prélèvement de la spermathèque (Collins 2000). Il faut noter que le sacrifice des individus est inévitable quel que soit le type d'analyses pratiquées.

Le volume de semence produit par les mâles ainsi que le nombre de spermatozoïdes produits sont des indicateurs intéressants du fait que ces paramètres peuvent jouer sur l'abondance de la descendance dans la colonie (Schluns et al. 2003, Schluns et al. 2004). Le volume de semence est mesuré suite à la collecte du sperme dans un capillaire et le nombre de spermatozoïdes est déterminé, le plus souvent, par comptage sur cellule de numération. La viabilité des spermatozoïdes dans le sperme tient également un rôle prépondérant puisque celle-ci peut affecter la qualité du sperme stocké dans la spermathèque (Collins 2000). La viabilité des spermatozoïdes est le plus souvent déterminée par utilisation de colorants fluorescents tels que le SYBR-14 qui marque en vert le noyau des spermatozoïdes quelle que soit leur viabilité et l'iodure de propidium qui marque en rouge les noyaux des spermatozoïdes morts. En effet, le SYBR-14 a la propriété de traverser les structures membranaires intactes alors que l'iodure de propidium ne pénètre que les membranes détériorés des spermatozoïdes morts. La viabilité est déterminée dans ce cas par microscopie à fluorescence ou par cytométrie de flux (Collins and Donoghue 1999, Tofilski et al. 2012).

Chez la reine, le nombre ainsi que la viabilité des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque ne font que décroître au cours du temps du fait du prélèvement continu, pour fertiliser les œufs, et du vieillissement lié à la conservation sur le long terme. La qualité du sperme stocké dans la spermathèque étant essentielle pour le potentiel reproducteur et la longévité de la reine, la considération de ces paramètres est incontournable pour évaluer sa qualité (Harbo 1979, Szabo and Heikel 1987, Lodesani et al. 2004).

3. Problématique

Dans un contexte de déclin des populations d'abeilles domestiques, les apiculteurs relatent régulièrement une baisse de qualité des reines. Entre autres, diverses enquêtes en Amérique du nord et en Europe, sur les causes liées aux pertes hivernales de colonies observées, ont clairement incriminé un dysfonctionnement des reines (vanEngelsdorp et al. 2008, Brodschneider et al. 2010, Genersch et al. 2010). La baisse de qualité se traduit par une diminution ou un arrêt de ponte, la présence d'un couvain d'ouvrières parsemé, un nombre excessif de mâles révélant une ponte anormale d'œufs non fertilisés, des renouvellements de reine prématurés ou une absence de reine (Camazine et al. 1998, vanEngelsdorp and Meixner 2010). Ces défaillances peuvent en partie s'expliquer par des effets directs des stressseurs environnementaux. En effet, les pesticides et les agents infectieux peuvent impacter les reines en affectant leur survie, en perturbant leur physiologie (immunité, défenses anti-oxydantes, communication chimique...), en induisant des dégénérescences ovariennes ou encore en altérant la qualité du sperme stocké dans la spermathèque (Camazine et al. 1998, Alaux et al. 2011, Gauthier et al. 2011, Collins and Pettis 2013, Sandrock et al. 2014, Williams et al. 2015, Chaimanee et al. 2016, Dussaubat et al. 2016). De plus, il est suspecté qu'une pénurie de mâles en bonne santé et produisant des semences de qualité soit à l'origine de reines pauvrement accouplées ayant également pour conséquences des dysfonctionnements de celles-ci (Camazine et al. 1998, Rhodes and Somerville 2003). Cependant, les effets des stressseurs environnementaux sur les mâles n'ont été que très peu étudiés et concernaient essentiellement les effets du parasite *Varroa destructor* et les traitements antiparasitaires utilisés pour le réguler. Entre autres, il avait été montré que des traitements antiparasitaires (Coumaphos et Tau-fluvalinate) et qu'une infestation par le parasite *Varroa* pouvaient altérer la survie et/ou la fertilité des mâles (DelCacho et al. 1996, Rinderer et al. 1999, Sylvester et al. 1999, Collins and Pettis 2001, Duay 2002, Burley et al. 2008).

Au début de ce travail de thèse, aucune étude sur les faux-bourçons ne s'était intéressée aux effets d'une exposition aux pesticides utilisés en agriculture intensive pour réguler les populations d'insectes ravageurs ni aux effets de parasites autres que le *Varroa*. De plus, aucun lien n'avait clairement été établi entre la baisse de qualité des mâles induite par un stressseur environnemental et l'appauvrissement de la qualité des reines.

Partant de ce constat, nous avons émis deux hypothèses.

- (i) La première hypothèse était que les facteurs de stress tels que les insecticides systémiques (particulièrement néonicotinoïdes et phénylpyrazoles) et les microsporidies pathogènes telles que *Nosema ceranae*, particulièrement incriminés dans le déclin des populations d'abeilles, pouvaient affecter l'intégrité physiologique des mâles dont leur fonction reproductrice.
- (ii) La seconde hypothèse repose sur le fait qu'une baisse de qualité des mâles exposés aux stressseurs environnementaux pourrait se traduire par des effets délétères sur le potentiel reproducteur de reines non-exposées.

Partie 2

Mise au point d'outils d'étude des
effets des stressseurs
environnementaux sur la fertilité
des faux-bourçons

Avant-propos

Le manque d'études concernant les effets de stress environnementaux sur la fertilité des faux-bourçons peut en partie s'expliquer par la difficulté à élever ces derniers (Ruttner 1976). Dans des conditions naturelles, la production de mâles au sein des colonies a lieu principalement du début du printemps au début de l'été, période au cours de laquelle les essaimages et les supersédures nécessitent leur présence pour féconder les jeunes reines. Cette période d'élevage coïncide généralement avec un climat favorable et une abondance des ressources. Or, si ces conditions propices se dégradent, les mâles sont éliminés très rapidement des colonies (Winston 1987, Boes 2010). Ceci explique que, bien que des outils d'analyse de la qualité du sperme soient disponibles, aucune méthode d'élevage standardisée des faux-bourçons n'existait. Ainsi, la première étape de ce travail a consisté à développer au moins une méthode fiable pour évaluer les effets sur les mâles d'une exposition à des stress biotiques et/ou abiotiques. Dans ce but, différentes approches d'élevage en conditions contrôlées et semi-contrôlées ont été développées de la naissance à la maturité sexuelle des individus. La première approche, en conditions de laboratoire, consiste à élever des mâles accompagnés d'abeilles nourrices dans de grandes cages, ayant les mêmes proportions que les cages de type Pain beaucoup plus petites (Pain 1966), placées dans une pièce climatisée pour simuler l'environnement de la colonie. La deuxième, en conditions semi-contrôlées, consiste à élever des mâles en petites colonies orphelines placées sous tunnels recouverts d'un filet anti-insecte. Cette dernière approche tend à se rapprocher des conditions naturelles du fait que les colonies sont alimentées par des abeilles butineuses qui doivent s'approvisionner sur une source de nourriture placée à l'extérieur de la ruche. Une comparaison de ces deux méthodes développées avec celle d'un élevage des mâles dans des colonies placées en conditions naturelles a été effectuée.

Ces travaux ont fait l'objet d'une première publication :

« Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions »

Faten Ben Abdelkader*, **Guillaume Kairo***, Sylvie Tchamitchian, Marianne Cousin, Jacques Sénéchal, Didier Crauser, Jean Paul Vermandère, Cédric Alaux, Yves Le Conte, Luc P. Belzunces, Naima Barbouche, Jean-Luc Brunet

* Contribution égale

Apidologie (2014) 45 : 215-223

Résumé

Dans le but d'évaluer la qualité de leur semence, des faux-bourçons ont été élevés avec succès, pendant une durée de 20 jours de la naissance à la maturité sexuelle, dans des conditions contrôlées de laboratoire, semi-contrôlées et naturelles. Suite à ces élevages, les semences collectées des mâles issus des différents groupes ont été analysées et comparées. Contrairement aux semences des mâles élevés en conditions semi-contrôlées, celles de mâles élevés en conditions de laboratoire et naturelles présentaient une plus faible concentration en spermatozoïdes, une plus faible quantité de protéines, une plus grande quantité d'ATP et une plus grande activité de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD). De plus, la mesure du potentiel réducteur du sperme, indicateur de l'activité métabolique, reflétait une plus grande viabilité apparente des spermatozoïdes des mâles élevés en conditions de laboratoire. Dans le cas de cette étude, la qualité des semences des mâles élevés en conditions contrôlées de laboratoire et naturelles tendent à se rapprocher.

Article 1 : Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions

Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions

Faten BEN ABDELKADER^{1,2}, Guillaume KAIRO¹, Sylvie TCHAMITCHIAN¹,
Marianne COUSIN¹, Jaques SENECHAL¹, Didier CRAUSER¹, Jean Paul VERMANDERE¹,
Cédric ALAUX¹, Yves LE CONTE¹, Luc P. BELZUNCES¹, Naima BARBOUCHE²,
Jean-Luc BRUNET¹

¹INRA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc CS 40509, 84914, Avignon, France

²Institut National Agronomique de Tunisie, Laboratoire de Zoologie et d'Apiculture, 1082, Tunis, Tunisia

Received 18 January 2013 – Revised 9 July 2013 – Accepted 5 September 2013

Abstract – In order to evaluate the semen quality among honey bee populations, emergent honey bee drones were maintained to sexual maturity for 20 days under laboratory, semi-field, and field conditions. The drones were successfully maintained in laboratory conditions. Drones under laboratory and field conditions presented a lower spermatozoa concentration and lower protein content than those under semi-field conditions. The viability of spermatozoa was higher under laboratory conditions, and the ATP content and the superoxide dismutase activity were higher both under laboratory and field conditions compared to drones kept under semi-field conditions. Hence, our data indicate that the semen quality was similar in drones maintained under laboratory and field conditions.

honey bee drones / sexual maturity / fertility / semen quality / sperm

1. INTRODUCTION

Insect pollination is both an ecosystem service and a major contributor to crop production all over the world. Indeed, around 80 % of flowering plants are entomophilous, i.e., dependent on insect pollination to reproduce, and it is estimated that half of the pollinators of tropical plants are bees (Bradbeer 2009). The pollinating efficiency of honey bees in agricultural landscapes is due to their large num-

bers, their anatomy and their foraging behavior on only one plant species at one time (Bradbeer 2009). However, the abundance and diversity of wild bees are now declining (Biesmeijer et al. 2006) and severe worldwide honey bee losses have been observed (Neumann and Carreck 2010). This could dramatically affect world food safety since the agricultural dependence on pollinators is continuously increasing (Aizen and Harder 2009).

Among the numerous factors that can affect honey bee colonies, a poor queen quality is often reported (van Engelsdorp and Meixner 2010). Since the queen is the sole reproductive female in the colony (laying around 1,000 eggs per day), any stress factor that affects its reproductive output can compromise the colony fate. The queen mates with

Faten Ben Abdelkader and Guillaume Kairo contributed equally.

Corresponding author: J. Brunet,
jean-luc.brunet@avignon.inra.fr
Manuscript editor: David Tarpy

an average of 12 drones (Rhodes 2002) and receives about 6 million spermatozoa into its oviducts from each male (Kerr et al. 1962). Approximately 5.5 million are transported to the spermatheca by active and passive mechanisms over a period of 40 h (Laidlaw and Page 1984). The post-mating changes are characterized by a new behavior (remain in the colony), physiology (lay around 1,000 eggs per day), and interactions with workers (grooming, feeding, courtship). However, the level and the quality of these post-mating changes can be affected by insemination quantity (Richard et al. 2007). Indeed, poorly inseminated queens produced a different mandibular gland chemical profile and are less attractive to workers. Thus, the frequency of queen loss in feral and commercial honey bee colonies might be influenced by spermathecal sperm depletion (Severson and Erickson 1989) and by queen reproductive status, i.e., egg-laying potential (Moretto et al. 2004), which might depend on drone availability and fertility.

However, little is known about factors that can affect drone fertility and the potential impact it can have on queen mating and colony fate. The main reason is that studying drones is a highly complicated task that since (1) in temperate regions, drones are found in honey bee colonies only during part of the summer season and their availability for studies is therefore limited to a short period of the year, (2) drone larvae can be easily reared outside the colony up to prepupal or pupal stage (Woyke 1969) but adult rearing in artificial conditions is a major challenge. In addition, the age at which drones mature and are able to mate with queens is not known with accuracy because of difficulties to assess it under field conditions. Rhodes (2002) stated that drones are mature at about 16 days of age and become less efficient for mating after 28 days (of age) but Moritz (1989) found that, 12-day-old drones are mature and their sperm may be used for queen insemination. The time required for drones to reach sexual maturity also depends on their genetics (Rhodes et al. 2010). Besides, many factors can affect the maturation process of drones such as the diet since an abundant and continuous source of pollen and proteins are necessary for sperm production (Cobey 1983). Therefore, de-

veloping methods for maintaining emergent drones under controlled conditions would help to better understand their biology and the factors that can modify their sexual maturation and fertility.

In this study, we succeeded to maintain emergent drones until sexual maturity under various conditions (laboratory, field, and semi-field) and compared the effect of these conditions on drone semen quality and quantity. Semi-field conditions represent a way to be in more natural conditions (close to the field conditions) but with the possibility to control some parameters, which would be impossible in the field. To standardize procedure of sperm maturation, we compared number, viability and energetic state of spermatozoa, the activity of superoxide dismutase (SOD), which is an enzyme that protects cells against damages caused by superoxide anion O_2^- , the most common free radical, and the level of proteins in semen, which play a role in male reproductive success by improving sperm competitive ability and modifying female behavior as shown in *Drosophila* (Findlay et al. 2008).

2. MATERIALS AND METHODS

All chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical (Saint Quentin Fallavier, France). Luminescence and absorbance were measured using a TECAN infinite® F500 plate reader.

2.1. Drone rearing

Experiments were performed in Avignon (France) on June 2011 with *Apis mellifera* L. colonies. To stimulate drone production, drone combs were introduced in 10 strong colonies (1 comb/colony). These colonies were treated with Amitraz in September 2010 to control *Varroa* population. The day before emergence, brood frames were placed into an incubator in the dark at 34 °C and 70 % relative humidity. Drones were considered mature if they could ejaculate when they are stimulated.

2.1.1. Laboratory conditions

Three large cages (42.5×30×55 cm; L×w×h) based on the design of Pain cages (Pain 1966) were

used to keep emergent drones in laboratory conditions (Figure 1). These cages were placed in a rearing room at 33 ± 1 °C and 60 ± 10 % humidity with 2 h/day lighting. Three wax combs were (13×40 cm; $w\times L$) attached to the top wall of each cage and spaced from each other by 3 cm. To mimic the hive environment, a Beeboost® (Pherotech) releasing a queen mandibular pheromone was placed in each cage. To maintain the hygiene of the cages, a filter paper was deposited on a removable floor and replaced every 2 days. To give more space to drones for flying, the surface of the removable floor was brought down by 3 cm every 2 days. Bees were fed with 50 % (w/v) sucrose syrup for 10 h/day (for possible treatments which are not reported here) and ad libitum with candy (Apifonda®), water, and pollen for the remaining 14 h. The food was contained in 15 mL Falcon™ tubes placed on both sides of the cage.

Drones have lower direct pollen consumption and digestive enzyme levels in the gastrointestinal tract than workers, although their nutrient needs are quite high. However, the workers provide them with pre-digested food, via proteinaceous glandular secretions



Figure 1. Cage designed to maintain drones under laboratory conditions.

and honey (Hrassnigg and Crailsheim 2005). Therefore, 200 emerging drones were introduced in each cage along with 1,000 emerging workers. The behavior of drones and workers was observed regularly to see whether the drones were accepted or rejected by the workers.

2.1.2. Semi-field conditions

Four queenless nuclei of 5,000 honey bees were placed under an outdoor tunnel covered with an insect proof mesh. Three hundred emerging drones were introduced in each nucleus. Each nucleus contained four empty frames, one worker brood frame, an empty box placed above the frames to give space for drones to move and a queen excluder under the hive body to prevent the exit of drones. No food was supplied inside the nuclei. The honey bee nuclei were introduced in the tunnel three days before drone introduction to get bees used to visit the feeder placed on a table at equal distance from the nuclei. This feeder consisted of a yellow cup containing the sucrose solution. A piece of cork and filter paper were placed on the surface of sucrose solution to enable the honey bees to land. To avoid overexposure to the sun, umbrellas were placed above each beehive. Honey bees received 50 % (w/v) sugar syrup from 9:00 to 12:00 a.m. each day. Outside this period, honey bees received water and pollen ad libitum.

2.1.3. Field conditions

Three hives were used in this test and 1,000 color-marked drones were confined into each hive. To prevent the loss of drones, a queen excluder was placed between the brood chamber and bottom board and a second queen excluder placed on top of the brood chamber beneath the upper box. The number of bees in each hive was estimated to 20,000–25,000 by weighting five frames out of ten with and without the bees.

2.2. Semen collection

For each condition, drone semen was collected after 20 days. Semen was collected by a manual eversion. In brief, drones of a known age were stimulated to ejaculate

by pressing on the thorax, which usually resulted in eversion of the endophallus. Semen was collected from the tip of the endophallus, with a glass capillary connected to a syringe filled with Kiev solution (36 g/L trisodium citrate, 3.6 g/L sodium bicarbonate, 0.6 g/L potassium chloride, 5 g/L glucose, 3 g/L sulfanilamide, pH 8.5, osmotic pressure=486 mOs/ml).

We pooled semen from different drones for each group to obtain 50 μ l of semen that was required for the different analysis. We had three pools in laboratory and field conditions and four pools in semi-fields conditions obtained from about 80–100 drone per each pool. We calculated an average volume of ejaculate per drone and it was 0.76 ± 0.17 μ L/drone.

2.2.1. Spermatozoa concentration

The semen was diluted (1:200) in the Kiev solution and spermatozoa were counted (15 μ L of diluted semen) under a phase contrast microscope by using a Malassez cell. The counting of each sample was done by three different persons in order to minimize errors.

2.2.2. Viability test

Viability test was performed with a Prestoblu[®] kit (Invitrogen) which is a resazurin-based solution that functions as a cell viability indicator. Prestoblu[™] reagent is quickly reduced by metabolically active cells, providing a quantitative measure of viability. Samples of diluted semen were put in a 96-white-well microplate. Each well contained 90 μ L of diluted semen containing 2 million spermatozoa and 10 μ L of Prestoblu[®]. The microplate was kept in obscurity for 10 min before measuring the absorbance at 570 nm according to the recommendations of the manufacturer.

2.2.3. ATP content

ATP content was performed with ATPlite[®] kit (PerkinElmer) in the same wells as the viability test. The ATPlite[®] assay system is based on the production of light caused by the reaction of ATP with added luciferase and D-luciferin. The emitted light is proportional to the ATP concentration within certain limits. For this, 50 μ L of a mammalian cell lysis

solution (PerkinElmer) were added to the 100 μ L of diluted semen containing 2 millions spermatozoa in each well and the whole microplaque was covered and shaken gently for 5 min with an orbital shaker at 700 rpm. Then, 50 μ L of substrate solution was added, the microplaque was covered and shaken for 5 min at 700 rpm and the microplaque was kept in the darkness for 10 min before measuring the luminescence intensity (LI) and measured by the Tecan plate reader.

2.2.4. SOD activity

Superoxide dismutase that catalyzes the dismutation of the superoxide anion (O_2^-) into hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2), provides an important defense against cell oxidative damage. In the SOD assays, superoxide ions were generated from the conversion of xanthine and O_2 to uric acid and H_2O_2 by xanthine oxidase (XOD). The superoxide anion then converted a tetrazolium salt into a formazan dye. The addition of SOD to this reaction reduces superoxide ion levels, thereby lowering the rate of formazan dye formation. SOD activity of the experimental sample was measured as the percent inhibition of the rate of formazan dye formation. The assay mixture contained 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.025 mM nitro blue tetrazolium (NBT) 0.1 mM xanthine and 50 mM phosphate/carbonate buffer (pH 7.8). The sperm volume corresponding to 2 million spermatozoa was adjusted to 90 μ L with Kiev medium and centrifuged at $1,200 \times g$ for 10 min at 23 °C. Ten microliters of supernatant containing seminal plasma was added to the assay medium. To start the reaction 20 μ L of xanthine oxidase (1.4 U/mg proteins) were added. SOD activity was spectrophotometrically measured during 5 min at 560 nm.

2.2.5. Protein assay

Proteins were assayed with the Bio-Rad protein assay[®] according to the method of Bradford (Bradford 1976). The assay medium contained 5 μ L of appropriately diluted semen, 40 μ L of Coomassie brilliant blue G-250 and 155 μ L of H_2O . The microplaque was kept in darkness for 20 min. Absorbance was read at 595 nm.

2.2.6. Statistics

The effects of conditions on semen quality (spermatozoa number, spermatozoa vitality, ATP and protein content and SOD activity) were assessed using the Wilcoxon Signed-Rank Test.

3. RESULTS

3.1. Drone behavior in laboratory conditions

Despite being maintained in artificial conditions in a large laboratory cage, bees did not exhibit any abnormal behavior. From the introduction in the cages, the emergent bees (workers and drones) took refuge between the wax frames and workers start quickly building the cells to store food. During the first days, workers and drones stood on the wax. Some workers moved to get pollen on the filter paper. The consumption of sucrose syrup was higher in the first days in all cages (data not shown). During cage maintenance, an important flying activity of drones was detected following the exposure to the light but it was decreased after 20 min. In laboratory conditions, emerged drones introduced inside cages were successfully accepted.

3.2. Semen quality

3.2.1. Concentration and viability of drone spermatozoa

Drones maintained under artificial (laboratory) conditions had a lower concentration of spermatozoa ($2.5 \pm 0.1 \times 10^6$ spz/ μ L semen) than drones maintained under semi-field conditions ($3.4 \pm 0.4 \times 10^6/\mu$ L semen) ($P=0.03$, Figure 2a). However, the concentration of spermatozoa produced by drones in field ($2.2 \pm 0.6 \times 10^6$ spz/ μ L of semen) and laboratory conditions was not different ($P=0.25$).

No difference was found in spermatozoa viability in semi-field and field conditions ($P=0.11$, Figure 2b). However, drones produced spermatozoa with a higher viability in laboratory conditions (34 and 38 % higher than drones maintained under semi-field and field conditions ($P<0.001$, $P<0.001$, respectively)).

3.2.2. ATP content and SOD activity

ATP content and SOD activity in semen of drones maintained under laboratory and field conditions were not different but higher than semen of drones maintained under semi-field conditions ($P=0.9$, $P=0.016$, $P=0.017$, Figure 3a, and $P=0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$ Figure 3b).

3.2.3. Protein content

Protein content in seminal plasma of drones maintained under semi-field conditions was 27

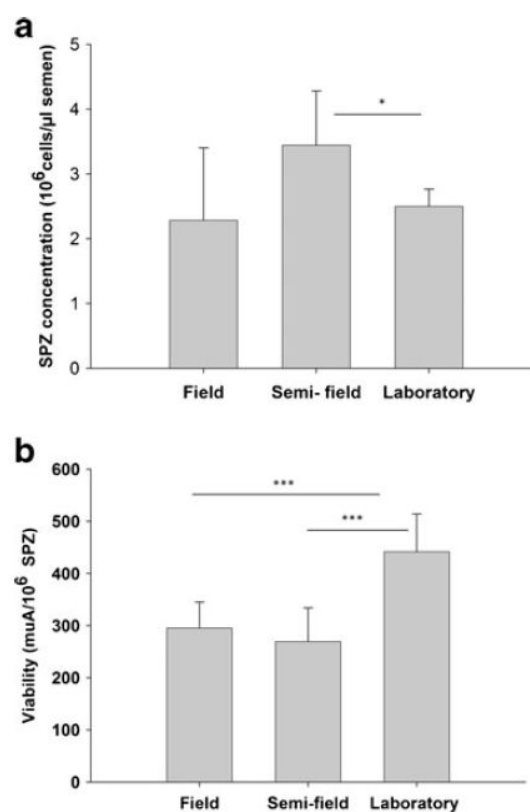


Figure 2. Concentration and viability of drone spermatozoa. The (a) concentration and (b) viability of spermatozoa (SPZ) expressed in milliunits of absorbance (muA) in the semen was determined in drones kept during 20 days under field, semi-field, and laboratory conditions. Semen was collected and spermatozoa were counted the same day. * and *** indicates significant differences at $P<0.05$ and $P<0.001$ respectively. Data corresponded to means \pm S.D.

and 50 % higher than in drones maintained under field and laboratory conditions ($P=0.03$, $P<0.001$) respectively (Figure 4). In addition, protein content in seminal plasma of drones was higher under field conditions than under laboratory conditions ($P<0.001$).

4. DISCUSSION

A large part of the literature deal with drone breeding under field conditions where the drones are kept in their colonies. Woyke (1969) presented a method of drone larvae rearing in laboratory but just until prepupal stage. Here, we showed for the

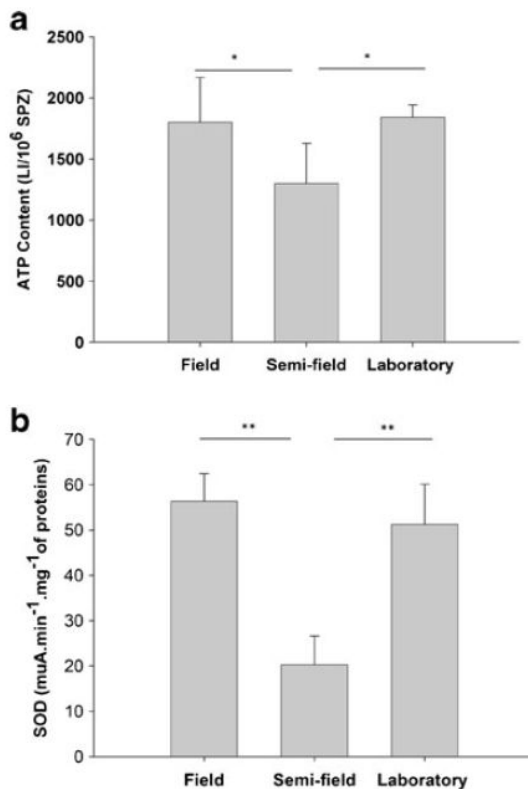


Figure 3. ATP content and SOD activity in drone semen. The (a) ATP content expressed in luminescence intensity (LI) and (b) SOD specific activity (AS) is expressed in milliunits of absorbance per minute per milligram of proteins ($\mu\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of proteins) are determined in semen of drones kept during 20 days under field, semi-field, and laboratory conditions. * and ** indicates significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively. Data corresponded to means \pm S.D.

first time that emergent drones can be kept in laboratory cage and in semi-field conditions for at least 20 days. These drones were kept until maturity and then analyses on sperm quality could be performed.

A major component of queen longevity is the concentration of sperm cells stored in the spermatheca (Cobey 2007). Spermatozoa concentration is regarded as a basis for understanding several aspects of biology of honey bee mating, including drone fitness, polyandry and sperm competition (Koeniger et al. 2005). The spermatozoa concentration produced per drone in our study ($2.2\text{--}3.4 \times 10^6/\mu\text{L}$ semen) was lower than that found by Rhodes et al. (2010) ($3.33 \times 10^6/\mu\text{L}$ semen). In other studies, the concentration of spermatozoa was much higher (Collins and Pettis 2001, 8.66×10^6 ; Schlüs et al. 2003, 11.9×10^6). The discrepancy between sperm counts from different studies may be due to differences in the counting method. In the previous works, the sperm number was determined in seminal vesicles, whereas in our study, sperm was counted in semen released at the tip of the endophallus following manual eversion. Regarding our study, the variation in sperm concentration between drones kept under the field, semi-field and laboratory conditions can be due to the conditions before semen collection. In fact, Bieńkowska et al. (2011) found that the higher and lower temperatures at which the drones were kept before semen collection had a significant impact on the total number of spermatozoa.

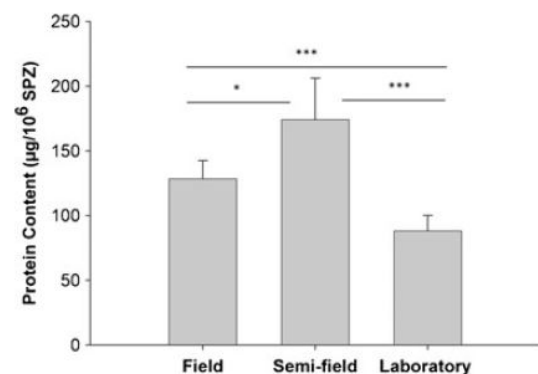


Figure 4. Protein content in drone semen. * and *** indicate significant differences at $P<0.05$ and $P<0.001$, respectively. Data corresponded to means \pm S.D.

A sperm viability test is a common assay to assess the quality of drone semen. Locke and Peng (1993) found that the sperm viability decreases with drone age. For example, they observed lower sperm viability in 4- and 6-week-old drones compared to 2-week-old but fully matured drones. In our experiments, we found that 2-week-old drones were not matured yet (data not shown) because they did not ejaculate. Furthermore, the physical and chemical properties of diluents (pH, osmolarity, and nutrients) and the handling methods can influence sperm cell survival (Verma 1978; Moritz 1984; Collins 2000). All experimental analysis being equal (20-day-old drones and same diluent), our results showed that drones kept under laboratory conditions present higher sperm viability than those kept under field and semi-field conditions.

Adenosine triphosphate (ATP) is the main energy source used by the sperm flagellum to initiate motility (Du Toit et al. 1993). Our results showed that spermatozoa of drones maintained under laboratory and field conditions present similar ATP content, which was lower in drones maintained under semi-field conditions. Froman and Feltmann (1998) reported that sperm cell motion depends on the physical environment, temperature, chemical environment, metabolic capacity, and structural integrity of the cells. In fact, oxidative stress, via the production of reactive oxygen species, has been shown to cause membrane deterioration, resulting in ATP depletion and decreased sperm movements (Gogol et al. 2009). Thus, we can hypothesize that spermatozoa of drones maintained in semi-field conditions could be more exposed to oxidative stress contrary to spermatozoa of drones maintained under laboratory and field conditions.

Superoxide dismutase is one of the antioxidant enzymes involved in the survival of drone spermatozoa (Wegener et al. 2012). SOD level has an essential role in maintaining the balance between reactive oxygen species (ROS) generation and degradation (Gavella et al. 1996). Kurpisz et al. (1996) demonstrated that SOD activity has a beneficial impact on sperm movement, which depends on the dynein ATPase that

hydrolyzes ATP to produce a flagellar beat. Our results showed significantly lower semen SOD activity and ATP content in drones maintained under semi-field conditions compared to the semen of drones maintained under field and laboratory conditions (Figure 3). However, when looking at the spermatozoa viability, spermatozoa of drones maintained under semi-field and field conditions presented the same rates of spermatozoa viability. The lower SOD level found in semen of drones maintained under semi-field conditions suggests that spermatozoa obtained under these conditions could undergo oxidative injuries which are normally limited by the activity of SOD isoenzymes (Johnson and Giulivi 2005). This is consistent with the work of Moretto et al. (2004) that shows that the tunnel environment induces immune-depression and reduces the potential to detoxify ROS and thus imposes the honey bee with an oxidative stress.

The presence of proteins in the seminal fluid is required for sperm viability (Avila et al. 2011). Fifty seven proteins were detected in the seminal fluid of honey bee (Baer et al. 2009). Some have known or predicted roles in maintaining sperm viability either by providing the sperm with its physiological needs, by protecting it from microbial attacks or by reducing oxidative stress in the sperm. The higher protein content found in semen of drones maintained under semi-field conditions could be explained by an organism response to injuries in order to protect spermatozoa through synthesis of antioxidant defense proteins and metal-binding proteins (King et al. 2011) where SOD was expressed.

5. CONCLUSION

This work describes two different methods (laboratory and semi-field) to obtain drones for studying the modulation of drone fertility by biotic and abiotic stressors based on artificial maintain. The laboratory method was especially useful to obtain fertile honey bee drones with a semen quality comparable to those of drones kept under field conditions. This could be useful for testing the effects of pesticides and/or pathogens on drone

quality. This method in laboratory conditions can be especially useful for scientists and queen breeders who are facing many difficulties when they rear drones to provide good semen quality in quantity with standardized processes. In conclusion, those results open new perspectives in the development of drone breeding and fertility studies and in the assessment of the possible impacts of different stressors on the reproduction.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by FranceAgrimer (FEAGA project 11-42R) and by Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Qualité du sperme de mâles d'abeilles maintenus, de l'émergence à la maturité sexuelle, en laboratoire, en conditions semi-naturelles ou de terrain

Mâle / *Apis mellifera* / maturité sexuelle / fertilité / sperme / qualité du sperme

Samenqualität von Honigbienen-Drohnen, die vom Schlupf bis zur Geschlechtsreife unter Laborbedingungen, Halbfreiland- bzw. Freilandbedingungen gehalten wurden

Honigbienen-Drohnen / Samenqualität / Spermien / Geschlechtsreife / Fertilität

REFERENCES

- Aizen, M.A., Harder, L.D. (2009) The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* 19(11), 915–918
- Avila, F.W., Sirot, L.K., LaFlamme, B.A., Rubinstein, C.D., Wolfner, M.F. (2011) Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu. Rev. Entomol.* 56(1), 21–40
- Baer, B., Heazlewood, J.L., Taylor, N.L., Eubel, H., Millar, A.H. (2009) The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics* 9(8), 2085–2097
- Bieñkowska, M., Panasiuk, B., Węgrzynowicz, P., Gerula, D. (2011) The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *J. Apic. Res.* 55(2), 161–168
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., et al. (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313(5785), 351–354
- Bradbear, N., Food and Agriculture Organization of the United Nations, et al. (2009). Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254
- Cobey, S. (1983) Drone rearing for instrumental insemination. III. *Am. Bee. J.* 123(4), 284–289
- Cobey, S.W. (2007) Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38(4), 390–410
- Collins, A.M. (2000) Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31(3), 421–429
- Collins, A.M., Pettis, J.S. (2001) Effect of *Varroa* infestation on semen quality. *Am. Bee. J.* 141(8), 590–593
- Du Toit, D., Bormman, M.S., Van Der Merwe, M.P., Du Plessis, D.J., Oosthuizen, J.M. (1993) Differential sperm motility scoring and sperm ATP concentrations. *Arch. Androl.* 30(1), 69–71
- Findlay, G.D., Yi, X., MacCoss, M.J., Swanson, W.J. (2008) Proteomics reveals novel *Drosophila* seminal fluid proteins transferred at mating. *PLoS Biol.* 6(7), e178
- Froman, D.P., Feltmann, A.J. (1998) Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.* 58(2), 379–384
- Gavella, M., Lipovac, V., Vucic, M., Rocic, B. (1996) Relationship of sperm superoxide dismutase-like activity with other sperm-specific enzymes and experimentally induced lipid peroxidation in infertile men. *Andrologia* 28(4), 223–229
- Gogol, P., Szczesniak-Fabianczyk, B., Wierzchos-Hilczner, A. (2009) The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod. Biol.* 9(1), 39–49
- Hrassnigg, N., Crailsheim, K. (2005) Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36(2), 255–277
- Johnson, F., Giulivi, C. (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol. Asp. Med.* 26(4), 340–352

- Kerr, W.E., Zucchi, R., Nakadaira, J.T., Butolo, J.E. (1962) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* **265**–276
- King, M., Eubel, H., Millar, A.H., Baer, B. (2011) Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* **57**(3), 409–414
- Koeniger, G., Koeniger, N., Tingek, S., Phiancharoen, M. (2005) Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. *Apidologie* **36**(2), 279–284
- Kurpisz, M., Miesel, R., Sanocka, D., Jedrzejczak, P. (1996) Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility. *Hum. Reprod.* **11**(6), 1223–1226
- Laidlaw, H.H., Page, R.E. (1984) Polyandry in honey bees (*Apis mellifera* L.): sperm utilization and intracolony genetic relationships. *Genetics* **108**(4), 985–997
- Locke, S.J., Peng, Y.S. (1993) The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.* **18**(2), 144–148
- Moretto, G., Guerra, J.C., Kalvelage, H., Espindola, E. (2004) Maternal influence on the acceptance of virgin queens introduced into Africanized honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Genet. Mol. Res.* **3**(3), 441–445
- Moritz, R.F.A. (1984) The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. Apic. Res.* **23**(3), 164–167
- Moritz, R.F.A. (1989) The Instrumental insemination of the queen bee. APIMONDIA, Bucharest
- Neumann, P., Carreck, N.L. (2010) Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* **49**(1), 1–6
- Pain, J. (1966) Note technique nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité. *Ann. Abeille* **9**(1), 71–76
- Rhodes, J. (2002). Drone honey bees: rearing and maintenance. *Agnote DAI* 112
- Rhodes, J.W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D.L., Wheen, G. (2010) Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie* **42**(1), 29–38
- Richard, F.-J., Tarpy, D.R., Grozinger, C.M. (2007) Effects of insemination quantity on honey bee queen physiology. *PLoS One* **2**(10), e980
- Schlüns, H., Schlüns, E.A., Praagh, J.V., Moritz, R.F.A. (2003) Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* **34**(6), 577–584
- Severson, D.W., Erickson, E.H. (1989) Seasonal constraints on mating and insemination of queen honey bees in a continental climate. *Apidologie* **20**(1), 21–27
- 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. *J. Invertebr. Pathol.* **103**(Suppl 1), 80–95
- Verma, L.R. (1978) Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. 1. Effect of different diluents on motility and survival. *Apidologie* **9**(3), 167–173
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Muller, K., et al. (2012) In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology* **65**(2), 126–131
- Woyke, J. (1969) A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. *J. Apic. Res.* **8**(2), 65–74

Bilan

Chacune des approches novatrices, développées en conditions semi-contrôlées et contrôlées, a permis d'obtenir, après 20 jours d'élevage, des faux-bourçons sexuellement matures capables de fournir des semences après stimulation. Cependant, la méthode d'élevage en conditions contrôlées de laboratoire, telle qu'elle est présentée dans cet article, ne permet pas un élevage optimal des faux-bourçons. En effet, si les taux de survie et de maturité étaient satisfaisants lors de cette étude et comparables à ceux des autres méthodes d'élevage en conditions semi-contrôlées et naturelles, ce ne fut pas le cas lors d'études conduites ultérieurement. Des différences importantes du taux de survie des mâles ont été observées entre les grandes cages dans lesquelles étaient maintenus les mâles. Cette variation inter-cage du taux de survie des mâles ne permettait pas de conduire des études comparatives fiables surtout que, dans certains cas, tous les mâles pouvaient être décimés avant l'acquisition de leur maturité sexuelle. Ces observations ont été associées à un changement de comportement des abeilles accompagnatrices entre les 10^{ème} et 12^{ème} jours des expérimentations. A ce stade, certaines accompagnatrices présentaient un comportement agressif envers les faux-bourçons se traduisant par un harcèlement continu pouvant aller jusqu'à la mise à mort. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette agressivité, observée dans les cages, pouvait être le fruit d'un changement physiologique des ouvrières en lien avec leur vieillissement. En effet, une partie de ces dernières auraient pu perdre ainsi leur statut d'abeilles nourrices. Cette perte de statut de nourrice résulterait ainsi d'une rupture de l'homéostasie au sein de la colonie artificielle (entité cage) en réaction à la présence d'individus exclusivement du même âge et à l'absence de reine et de couvain. De tels problèmes de surmortalité des mâles n'avaient pas été observés dans les autres conditions d'élevage pour lesquelles des abeilles et du couvain de tout âge étaient présents permettant même un élevage de nouvelles reines et offrant ainsi des conditions idéales pour entretenir des faux-bourçons. De ce fait, la méthode d'élevage en conditions de laboratoire nécessitait des améliorations avant de pouvoir être utilisée pour évaluer les effets de stress environnementaux sur la fertilité des mâles.

L'analyse des semences a également nécessité l'utilisation d'outils de diagnostic qu'il a fallu adapter ou mettre au point dans certains cas. Ces outils nous ont permis de réaliser des mesures de la concentration et de la viabilité des spermatozoïdes dans le sperme, du métabolisme (quantité d'ATP), des capacités anti-oxydantes (SOD) ou encore de la quantité totale de protéines. Par la suite, une partie de ces outils a été améliorée et de

nouveaux ont été mis au point ou développés. Lors de cette étude, l'évaluation de la concentration des spermatozoïdes a été effectuée à l'aide d'une cellule de numération de Malassez qui présentait une profondeur de champ de 200 μm . Cette profondeur trop importante peut expliquer des valeurs de concentration obtenues ($2,2$ à $3,4 \times 10^6$ spermatozoïdes/ μL) plus faibles que celles présentées majoritairement dans la littérature (7 à 10×10^6 spermatozoïdes/ μL). En effet, la profondeur de champ trop importante ne permet pas de visualiser l'ensemble des spermatozoïdes sur un plan optique lors des numérations au microscope et a pour conséquence une sous-estimation du nombre réel. Dans le but d'éviter cette sous-estimation et d'être plus en adéquation avec la réalité, une méthode de comptage avec une cellule de numération présentant une profondeur de champ de 20 μm a été développée par la suite. Par ailleurs, la viabilité apparente des spermatozoïdes a été évaluée à l'aide d'un test permettant de suivre la réduction de la rézasurine par des cellules métaboliquement actives. Toutefois, ce test, utilisé en biologie cellulaire comme indicateur de viabilité cellulaire, peut être faussé dans le cas où un facteur de stress perturbe l'activité métabolique des cellules et laisse entrevoir un résultat erroné. De ce fait, ce test a été utilisé par la suite non pas comme indicateur de viabilité mais comme indicateur de l'activité métabolique des spermatozoïdes. Pour répondre à l'absence d'un test de viabilité fiable, un test d'évaluation du taux de mortalité des spermatozoïdes utilisant un marquage à l'iodure de propidium a alors été adapté. Ce test se caractérise par une lecture de la fluorescence en microplaque permettant l'analyse simultanée d'un nombre important d'échantillon.

A ce stade, les méthodes d'élevage et les outils de diagnostic de la qualité des semences mis au point ont, toutefois, permis l'obtention d'une quantité de sperme suffisante pour conduire plusieurs types d'analyses de biologie cellulaire et de biochimie. Ces analyses ont mis en évidence que la méthode employée pouvait affecter les propriétés des semences des mâles. Ce constat a soulevé également des interrogations concernant l'incidence de la méthode d'élevage employée sur les résultats d'une exposition à des stress environnementaux. Malgré cela, ces nouveaux outils d'élevage, désormais disponibles, ont ouvert de nouvelles perspectives concernant les programmes d'élevage et de sélection des mâles en apiculture et ont permis, pour la première fois, d'entrevoir la possibilité d'évaluer les effets polluants environnementaux sur les mâles d'abeilles en conditions contrôlées et semi-contrôlées.

Partie 3

Effets des stressseurs
environnementaux sur la fonction
de reproduction des mâles et
conséquences sur l'appauvrissement
de la qualité des reines

1. L'exposition des faux-bourçons à l'insecticide systémique Fipronil impacte indirectement le potentiel reproducteur des reines

Avant-propos

Après la mise au point des différentes méthodes d'élevage permettant l'obtention de faux-bourçons sexuellement matures, nous avons entrepris d'étudier les effets d'un pesticide systémique sur la fertilité des mâles en utilisant l'approche semi-contrôlée. Le choix s'est porté sur cette méthode qui était alors la plus fiable parmi les deux développées. De plus, cette méthode d'exposition simule une exposition naturelle des mâles consécutive à une récolte de ressources alimentaires contaminées lors de l'activité de butinage. Le pesticide choisi est le Fipronil, substance de la famille des phénylpyrazoles, utilisé à travers le monde en phytoprotection et comme antiparasitaire pour ses propriétés insecticide et acaricide (Gibbons et al. 2015, Simon-Delso et al. 2015). Le Fipronil agit comme antagoniste des récepteurs GABA_A des synapses gabaérgiques, empêchant la liaison du neurotransmetteur sur son site qui aboutit normalement à l'hyperpolarisation du neurone et à une modulation négative du message nerveux. Ainsi, par son action d'inhibition des synapses inhibitrices, le Fipronil entraîne une hyperexcitation du système nerveux central suivie d'une phase de tétanie et de la mort de la cible biologique (Cole et al. 1993). Incriminé pour sa toxicité vis-à-vis des abeilles, il est suspendu dès 2004 en France puis en 2013 dans toute l'Europe pour son utilisation en enrobage des semences (EC 2013, EFSA 2013).

Dans cette étude, le choix s'est porté sur cette molécule pour sa capacité à contaminer le nectar et le pollen (Bonmatin et al. 2015), ressources alimentaires des abeilles, ainsi que pour ses effets secondaires. En effet, le Fipronil a la faculté d'affecter la production d'énergie de la cellule en ciblant la mitochondrie (Vidau et al. 2009, Vidau et al. 2011, Nicodemo et al. 2014, de Medeiros et al. 2015) dont le rôle est essentiel à la motilité et à la survie des spermatozoïdes. De plus, l'exposition au Fipronil conduit à la génération d'espèces réactives de l'oxygène et peut induire un stress oxydant responsable de l'oxydation des composés cellulaires (Wang et al. 2016). Entre autres, il a été montré qu'une exposition chronique des rats avait pour conséquence des dommages des structures membranaires et de l'ADN des spermatozoïdes (Khan et al. 2015). Enfin, le Fipronil induit

des effets reprotoxiques non seulement chez le rat mais aussi chez d'autres vertébrés et invertébrés terrestres et aquatiques (Chandler et al. 2004, Kitulagodage et al. 2011, Alves et al. 2013, Sun et al. 2014). En considérant l'ensemble de ces informations, nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition chronique au Fipronil pouvait engendrer des troubles de la fertilité des mâles d'abeilles *Apis mellifera L.* pouvant *in fine* se traduire par une baisse de la qualité du sperme stocké dans la spermathèque des reines dont dépend le potentiel reproducteur de ces dernières.

Ces travaux ont fait l'objet d'une seconde publication :

**« Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly
impairs queen reproductive potential »**

Guillaume Kairo, Bertille Provost, Sylvie Tchamitchian, Faten Ben Abdelkader, Marc Bonnet, Marianne Cousin, Jacques Sénéchal, Pauline Benet, André Kretzschmar, Luc P. Belzunces, Jean-Luc Brunet

Scientific Reports (2016) 6 : 31904

Résumé

La présence dans l'environnement de polluants, dont les pesticides, menace de nombreuses espèces et, dans certains cas, leur fonction de reproduction qui est essentielle à leur pérennité. Dans ce contexte, les effets de l'insecticide systémique Fipronil sur la fertilité des mâles de l'abeille domestique, une espèce pour laquelle un déclin est rapporté, ont été étudiés. Lors de cette étude, les mâles ont été exposés de la naissance à la maturité sexuelle en conditions semi-contrôlées, via une solution sucrée contaminée à une faible concentration environnementale de Fipronil [$0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$] récoltée sur un nourrisseur et rapportée à la colonie par les butineuses. Après 20 jours d'exposition chronique, les analyses des semences ont révélé une baisse du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes couplée à une augmentation de la quantité d'ATP et du potentiel réducteur traduisant une perturbation du métabolisme. Ces résultats mettent en avant les effets reprotoxiques du Fipronil vis-à-vis des faux-bourçons. L'insémination instrumentale de reines avec des semences de mâles exposés a eu pour conséquence une diminution du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque dont le contenu est essentiel à une activité de ponte pérenne. Ces résultats montrent sans équivoque que l'exposition des mâles à un pesticide peut affecter indirectement le potentiel reproducteur des reines et ainsi contribuer à l'appauvrissement de leur qualité et à leur défaillance largement observée au sein des ruchers du monde entier. En conséquence, les pesticides pourraient contribuer au déclin des populations d'abeilles par l'induction de troubles de la fertilité des mâles comme cela est observé avec le Fipronil.

Article 2 : Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil
indirectly impairs queen reproductive potential

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential

Received: 26 January 2016

Accepted: 26 July 2016

Published: 23 August 2016

Guillaume Kairo¹, Bertille Provost², Sylvie Tchamitchian¹, Faten Ben Abdelkader^{1,3}, Marc Bonnet¹, Marianne Cousin¹, Jacques Sénéchal¹, Pauline Benet², André Kretzschmar⁴, Luc P. Belzunces¹ & Jean-Luc Brunet¹

A species that requires sexual reproduction but cannot reproduce is doomed to extinction. The important increasing loss of species emphasizes the ecological significance of elucidating the effects of environmental stressors, such as pesticides, on reproduction. Despite its special reproductive behavior, the honey bee was selected as a relevant and integrative environmental model because of its constant and diverse exposure to many stressors due to foraging activity. The widely used insecticide Fipronil, the use of which is controversial because of its adverse effects on honey bees, was chosen to expose captive drones in hives via syrup contaminated at 0.1 µg/L and gathered by foragers. Such environmental exposure led to decreased spermatozoa concentration and sperm viability coupled with an increased sperm metabolic rate, resulting in drone fertility impairment. Subsequently, unexposed queens inseminated with such sperm exhibited fewer spermatozoa with lower viability in their spermatheca, leaving no doubt about the detrimental consequences for the reproductive potential of queens, which are key for colony sustainability. These findings suggest that pesticides could contribute to declining honey bee populations through fertility impairment, as exemplified by Fipronil. More broadly, reproductive disorders should be taken into consideration when investigating the decline of other species.

Over recent decades, Earth has been experiencing a major crisis due to an alarming rate of species loss, suggesting a sixth mass extinction¹. In this context, more than 25% of studied plant and animal species are threatened². Among pollinating insect species, data available from several studied bee species, such as bumble bees and honey bees, have shown the existence of some cases not only of population decline but also of general or relatively localized extinction³. The anthropogenic loss of species is the result of major threats, such as the exploitation of resources, the destruction and fragmentation of habitats, the introduction of invasive species, and the spread of diseases and industrial or agrochemical pollutants^{1,4}. Two stressors in particular, pesticides and diseases, are known to disrupt reproductive function, which is essential for species survival. Some of these environmental stressors can directly disrupt fertility in humans, as observed during the last century⁵, either directly or through the endocrine system, which plays a central role in reproductive functions⁶. Such reproductive disorders have been reported in many species other than humans⁷, and especially in some insects, manifested by mating behavior and fertility impairments^{8–12}, suggesting the potential for similar fertility effects in the honey bee (*Apis mellifera* L.).

Honey bees are social insects of great economic and ecological interest, and declining populations have been reported over the last three decades^{13,14}. Among the suspected causes of this decline¹⁴, queen failure appears to be particularly significant^{15–17}. The symptoms of this phenomenon include the following: decreases in or an absence of egg laying; the appearance of a lacunar brood, i.e., an abnormal brood surface exhibiting scattered empty cells; the excessive laying of unfertilized eggs, resulting in drone births; and early supersedure or queenless colonies^{14,18}.

¹INRA, UR 406 Abeilles & Environnement, Toxicologie Environnementale, Avignon, 84914, France. ²SUPAGRO, Laboratoire de Pathologies de l'Abeille, Montpellier, 34090, France. ³INAT, Laboratoire de Zoologie et d'Apiculture, Tunis, 1082, Tunisie. ⁴INRA, UR 546 Biostatistiques & Processus Spatiaux, Avignon, 84914, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-L.B. (email: jlbrunet@paca.inra.fr)

These symptoms may be due to queen exposure to pesticides^{19–22} and biological agents, such as the ectodermic parasite *Varroa destructor*, the microsporidium *Nosema ceranae*, or viruses^{18,23,24}. A shortage of available healthy drones (i.e., male honey bees) with high-quality semen may also cause queens to become poorly mated, thus diminishing queen quality^{18,25,26}. Although queens have been studied more often than drones, few reports have characterized the impacts of environmental stressors on drone survival and fertility. These studies are mainly focused on the effects of parasites and veterinary treatments^{26–28}.

However, no studies have established a direct relationship between insecticides, drone fertility, and the final impact on the queen. Thus, we assessed whether reduced queen quality could also be the result of disrupted drone fertility induced by sublethal exposures to insecticides. Our attention was focused on Fipronil, a pesticide widely used for its systemic properties²⁹ in numerous varieties of agricultural and veterinary applications. Because Fipronil diffuses into plant tissues, it contaminates nectar and pollen, which are food sources for the honey bee²⁹. In addition, honey bees in hives could be exposed to Fipronil when it is used to control the small hive beetle *Aethina tumida*³⁰. This neurotoxic phenylpyrazole insecticide is known to induce lethal and sublethal effects at the cellular^{31,32}, behavioral^{33–36} and colonial level³⁶ in honey bees as well as in non-target invertebrates³⁷. Interestingly, Fipronil also alters the reproductive functions of some terrestrial and aquatic vertebrates and invertebrates^{38–42}. To study the impact on fertility, drones, which depend on workers for their food supply, were chronically exposed throughout their sexual maturation to a contaminated food source gathered by foragers. This food was a syrup solution contaminated with Fipronil at 0.1 µg.L⁻¹ (0.087 µg.kg⁻¹; density, d = 1.1488), which is an environmentally relevant concentration²⁹. The impacts of this exposure on foraging activity and drone life cycle traits and sperm quality were monitored. The impacts on queen fertility were also investigated by analyzing the spermathecal content of queens instrumentally inseminated with sperm from exposed or unexposed drones. The results are discussed in terms of potential impacts on queen performance at the colony level.

Results and Discussion

Fipronil affects male fertility. The apparent effects of sublethal exposure to Fipronil were investigated under semi-field conditions (Fig. 1A). No significant effects were observed on the foraging behavior of workers (Fig. 1B,C) or on drone survival (Table 1). These results are not surprising because behavioral effects of Fipronil are observed in worker bees only at concentrations $\geq 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ^{33,34,36}. However, no information about the effects of Fipronil on drones was available. In this context, drones were exposed to Fipronil via food brought back to the hive by foragers during the period from emergence to drone sexual maturity. However, drones directly consuming the syrup with Fipronil at 0.1 µg/L upon the return of foragers cannot be excluded. In addition, drones could also have consumed contaminated food stored in the hive with concentrations of Fipronil different from that of the syrup. During hive storage and while the honey matures, Fipronil could be concentrated, partly transferred to bees or metabolized by bees or by enzymes excreted in honey⁴³, and metabolites could appear. Thus, drone exposure is not directly controlled during this period. Hence, to assess the Fipronil exposure, the concentration of Fipronil and its metabolites in honey stored in hives after 20 days of foraging was determined using GC-MS/MS chemical analysis. However, the values of Fipronil and metabolite concentrations were lower than the limit of detection (LOD = 0.2 µg/kg of honey). Residues in males were not analyzed because we had conducted a preliminary assessment of the exposure. This latter assessment was based on the sugar consumption of drones (21–90 mg/drone/day⁴⁴), the sugar concentration in the food (50% w/v), the exposure period (20 days) and the Fipronil concentration in the syrup (0.1 µg/L). Thus, in the worst case scenario (i.e., the highest food consumption, absence of elimination and complete bioaccumulation of the doses ingested), the cumulative dose of Fipronil ingested per drone during the exposure period was estimated at 360 pg/drone. Considering that drones weigh approximately 196–225 mg⁴⁵, this cumulative amount of Fipronil corresponded to 1.84 µg of Fipronil per kg of drone for a drone weight of 196 mg; this amount was less than the LOD of the analytical method (3 µg/kg of bees). Despite this low exposure level, Fipronil affecting the development of drones could not be excluded. However, no effects on drone sexual maturity rate or semen volume were observed (Table 1).

Because no apparent effects were observed at the individual level, the quality of semen was studied in greater detail by analyzing sperm count and other physiological parameters. Drones achieve spermatogenesis at the larval stage. Thus, number of spermatozoa at emergence is determined early. Therefore, as exposure to Fipronil started at emergence, it could not affect the production of spermatozoa and could only affect seminal fluid production, which occurs during drone's sexual maturation at approximately 15–20 days after emergence. During this period, spermatozoa mature in the seminal vesicles with the head anchored in the secretory epithelium and are released in the seminal gland at sexual maturity⁴⁶. In the present study, the semen volume produced per drone was not affected by exposure to Fipronil, which also suggested that Fipronil has no apparent effect on semen quality (Table 1). Nevertheless, exposure to Fipronil induced a decrease in total spermatozoa concentration (median of 8.59×10^6 spermatozoa vs. 10.47×10^6 spermatozoa in controls, $P < 0.0001$, Fig. 2A) and an increased spermatozoa mortality rate (median of 40.91% vs. 30.32% in controls, $P < 0.0001$, Fig. 2B) in mature drones. Two hypotheses linking the decrease in spermatozoa concentration in semen to Fipronil exposure can be proposed: (i) a portion of the spermatozoa (dead or alive) remained bound to the seminal vesicle membrane and were not available in the ejaculated semen; and/or (ii) spermatozoa that died during the maturation process may also be lysed prior to ejaculation.

At the cellular level, reducing potential corresponds to the ability of cells to metabolically reduce compounds or to passively reduce oxidants resulting from metabolic activity or ionizing rays. Reducing potential was increased by exposure to Fipronil (median of 0.59 absorbance units (AU) vs. 0.42 AU in controls, $P < 0.0001$, Fig. 2C). The cellular ATP content produced by mitochondria was also increased (median of 2002.59 luminescence intensity (LI) vs. 2676.78 LI in controls, $P < 0.0001$, Fig. 2D). In spermatozoa, ATP corresponds to a supply of energy available not only for metabolic activity but also for motility. Similar metabolic modulations have been observed in other cell types as well as mitochondria^{31,47–49}; in addition, depending on the mode of exposure, these

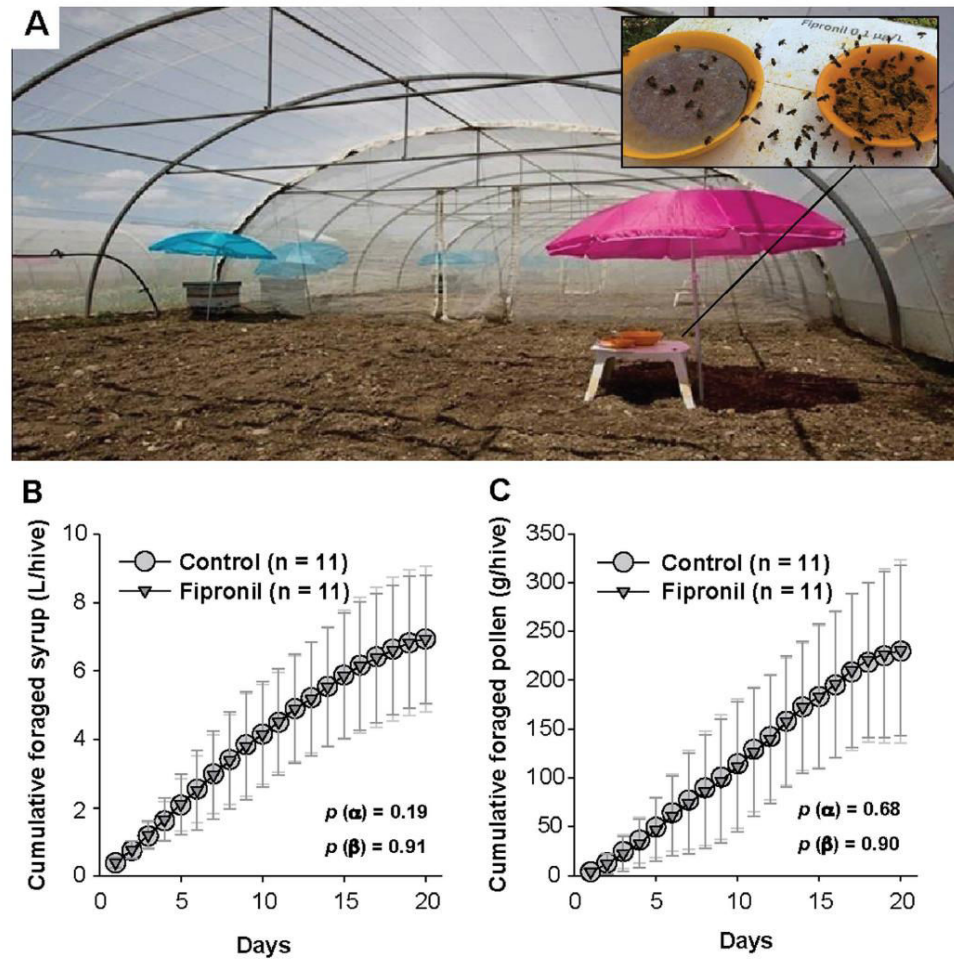


Figure 1. Foraging behavior in colonies. For 20 days, from drone emergence to sexual maturity, colonies were supplied daily with sugar syrup (50% w/v) *ad libitum* using a feeder, for harvesting by foragers from 8:30 a.m. to 11:30 a.m.; the syrup was replaced with crushed pollen and water for the remainder of the day. While the hives were fed during the exposure period, foraging behavior was monitored in 44 colonies from 22 tunnel compartments. (A) Illustration of the experimental platform; (B) cumulative foraged syrup; and (C) cumulative foraged pollen. The data represent the mean \pm the standard deviation of the daily cumulative foraged quantity observed in each compartment (1 feeder for 2 hives). For each treatment, the data correspond to the set of values from 4 experiments conducted between 2012 and 2014 (n = 11). Statistical analyses of the growth rates of cumulative foraging (α) and maximum cumulative quantities (β) were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on the different experiments.

	Ctrl (n = 22)	Fip (n = 22)	p value
	mean \pm SD	mean \pm SD	
Drone survival rate (%)	45.3 \pm 22.8	39.8 \pm 22.4	0.296
Drone maturity rate (%)	62 \pm 9.6	64.3 \pm 10.1	0.405
Semen volume (μ L/drone)	0.83 \pm 0.11	0.85 \pm 0.11	0.602

Table 1. Effects of chronic Fipronil exposure on drone life cycle traits. At sexual maturity, which corresponded to the end of the exposure period, the hives were opened in order to capture 20-day-old cloistered drones and to collect semen. Drone survival and maturity as well as the average semen volume per drone were determined for each hive. The data represent the mean values \pm standard deviations obtained from drone populations recovered from hives in 4 experiments monitored from 2012 to 2014 (n = 22). Statistical analyses were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on the different experiments.

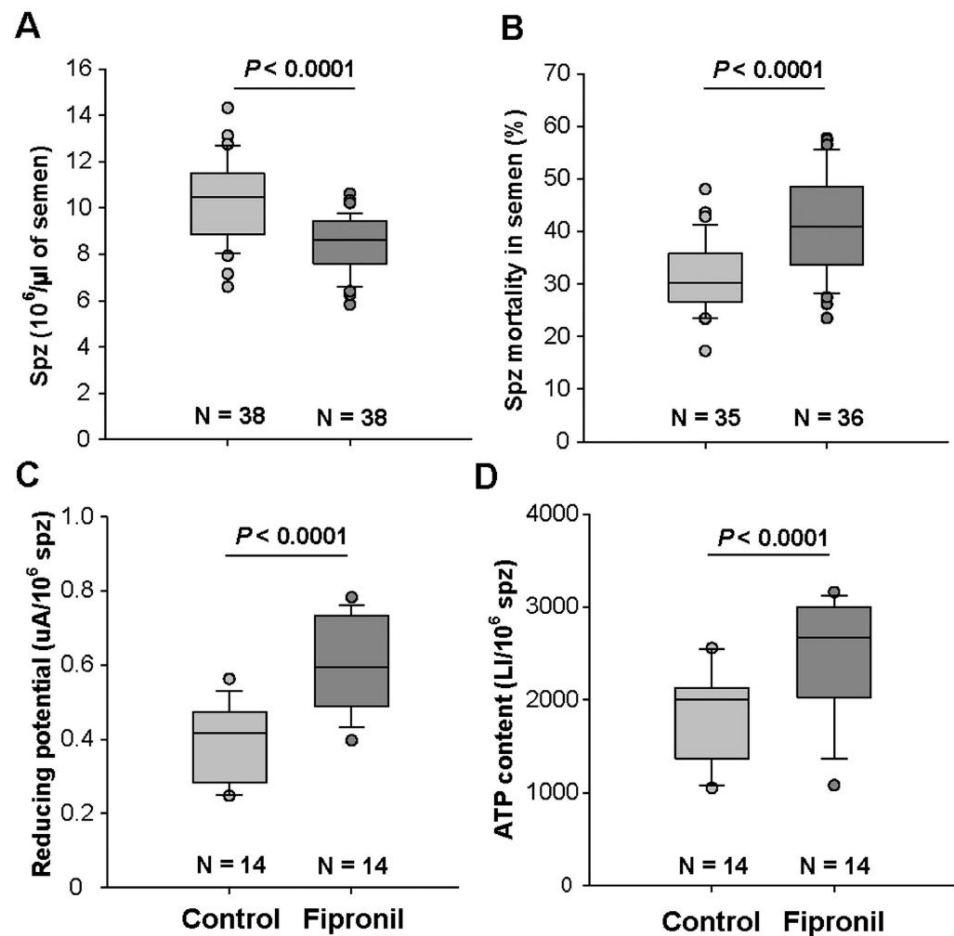


Figure 2. Effects of chronic exposure to Fipronil on drone fertility. The day after collection, the semen samples were analyzed to assess the effects of Fipronil exposure on drone fertility. (A) Total spermatozoa (spz) concentration in semen, including live and dead spermatozoa. (B) Mortality rate of spz expressed as a percentage (%). (C) Reducing potential of semen in absorbance units (AU $\lambda = 570$ nm), corresponding to the rate of reduced resazurin per million spz. (D) Rate of adenosine triphosphate (ATP) in spz, expressed as the luminescence intensity (LI) per million spz. For each parameter, the data correspond to the values obtained in experiments conducted between 2012 and 2014. The reducing potential and ATP content assays were only performed during the three first experiments; “n” indicates the number of samples for each treatment and parameter. Statistical analyses were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on the different experiments.

modulations can lead to cell death^{48–50}. We assume that these effects on the mortality and concentration of spermatozoa are due to physiological disruptions because an increase in energetic metabolism could lead to oxidative injuries by generating reactive oxygen species, as previously confirmed for Fipronil^{38,49,50}. Although spermatozoa exhibit antioxidant defenses⁵¹, an overload of these defenses can lead to cell death, explaining the high mortality rate of spermatozoa in drones exposed to Fipronil. Moreover, the higher levels of ATP observed in the semen of exposed drones could be due not only to increased metabolism but also to decreased ATP consumption, resulting in lower sperm motility. This reduced ATP consumption could adversely impact the fertility of the queen because motility is involved in the competition between spermatozoa during the process of migrating to reach the spermatheca⁵² first and subsequently fertilize the eggs⁵³. These results strongly suggest that the reproductive potential of drones could be affected by chronic exposure to Fipronil via food. These detrimental effects of Fipronil on drone sperm quality also suggest a potential impact on queen fertilization.

Incidence on the queen. The effects of drone exposure to Fipronil on the queen were investigated by analyzing the weight and spermathecal content of sister queens 14 days after they were instrumentally inseminated with a fixed volume of semen (8 μ L)⁵⁴. No significant differences were observed in the weights of queens inseminated with the semen of drones exposed or not exposed to Fipronil (Fig. 3a). Conversely, queens inseminated

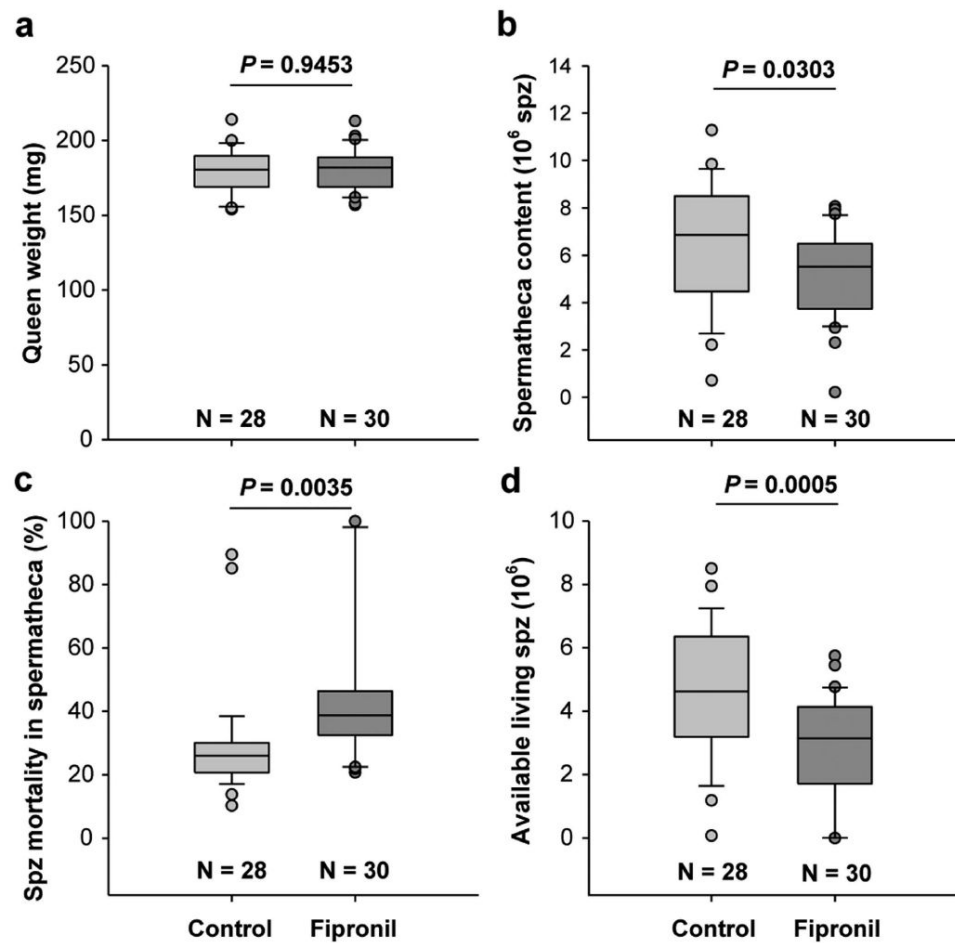


Figure 3. Consequences of drone exposure on queens. Following the exposure of drones in the experiment conducted in 2014, a portion of the collected semen was used to instrumentally inseminate 2 groups of 40 queens each. Two weeks later, the surviving queens in the control ($n = 28$) and Fipronil groups ($n = 30$) were weighed and dissected, and the spermathecae were analyzed to determine (a) queen weight, (b) the number of spermatozoa (spz) stored in the spermatheca, (c) the mortality rate of spz expressed as a percentage (%) of stored spz, and (d) live spz available to fertilize eggs, deducted from the two previous parameters. A t-test was applied to statistically analyzed queen weight (a). For parameters (b–d), statistical analyses were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on the hive from which the sperm capillaries originated.

with semen from exposed drones stored fewer spermatozoa (median: 5.52×10^6 vs. 6.86×10^6 in the controls, $P = 0.0303$, Fig. 3b) and exhibited a greater proportion of dead spermatozoa (median: 38.72% vs. 25.96% in the controls, $P = 0.0035$, Fig. 3c). Consequently, a 30% decrease in live spermatozoa recovered in spermatheca (median values: 4.62×10^6 in treatment vs. 3.14×10^6 spermatozoa in the control, $P = 0.0005$, Fig. 3d) was observed, reflecting a decrease in egg fertilization potential. The volume of the spermatheca is known to be correlated with the queen's body weight¹⁹, which was identical in the two queen groups. Thus, the differences in spermatheca content in the two queen groups are attributable to differences in semen properties instead of queen physiology. This unprecedented result demonstrates that the reproductive potential of the queen can be indirectly affected by a chemical stressor by altering the semen of exposed drones.

These results suggest effects on sperm transfer mechanisms, which are somewhat complex in the honey bee. The similarity of the characteristics of the spermatheca content (numbers of total and live spermatozoa) to the injected semen suggests a passive transfer of spermatozoa from the oviduct to the spermatheca. After mating, the oviducts of queens receive an excess of approximately 90×10^6 spermatozoa from several drones, and only a small portion (4×10^6 to 7×10^6) reaches the spermatheca by active migration or passive transport^{52,55}. This suggests that a slight variation in the initial quantity of spermatozoa received by the queen does not influence the number of spermatozoa stored in the spermatheca. This assumption is consistent with the absence of a correlation between the initial number of spermatozoa in the semen used to inseminate the queens and the quantity of

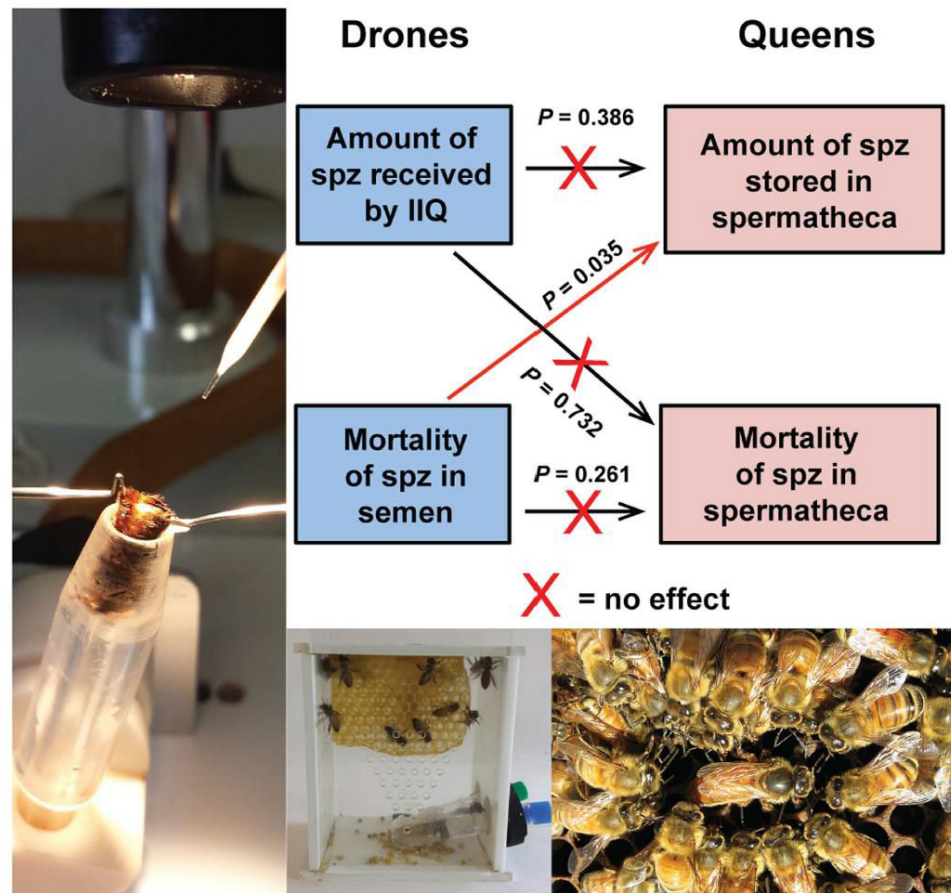


Figure 4. Relationships among drone semen characteristics and spermathecal content. For all of the instrumentally inseminated queens (IIQ) ($n=58$), the quantity and mortality of injected spermatozoa (spz) were compared with those of spz stored in the spermatheca. Arrows correspond to the effect of one factor on another. The number of spz received by the queen was calculated based on the concentration and volume of injected spz ($8\mu\text{L}$). Statistical analyses were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on the hive from which the sperm capillaries originated. linear mixed model with a random effect on the different experiments.

spermatozoa recovered in the spermatheca ($P=0.386$, Fig. 4). Because the quality of semen in the spermatheca is superior to that in the oviduct⁵⁶ and because dead spermatozoa do not migrate to the spermatheca^{52,57}, the migration process may be considered as a mechanism of selecting the best spermatozoa for storage to compensate for lower sperm quality and to maintain the sustainability of the species. Our data indicate that this protective mechanism may be circumvented when fertilization is performed with altered semen from drones exposed to environmental pollutants, such as Fipronil, resulting in decreased semen numbers and mortality rate in the spermatheca. Considering all modalities together, only the number ($P < 0.035$, Fig. 4) but not the mortality rate ($P=0.261$, Fig. 4) of spermatozoa stored in the spermatheca was affected by the number of dead spermatozoa in the semen during the migratory process. Considering the modalities separately, the discrepancy in the observed spermatozoa number and mortality in the spermatheca between the control and Fipronil modalities could have resulted from delayed effects of the drone exposure. These delayed effects could be consequences, at least in part, of the metabolic disruptions previously observed in the sperm, i.e., the increased reducing potential and ATP content. Thus, we hypothesize that the reduced quantity of spermatozoa recovered from the spermatheca of queens inseminated with semen from exposed drones could be also explained, independently of the phenomenon described above, by putative negative effects of such metabolic disruptions on the ability of spermatozoa to migrate. Similarly, we hypothesize that the higher mortality rate of spermatozoa observed in the spermatheca could be explained either by an impairment in the adaptation of spermatozoa having reached the spermatheca to the spermathecal fluid, which is necessary for long-term storage⁵⁸, or by an increase of the mortality dynamic of the stored spermatozoa, which is a phenomenon that occurs naturally in the spermatheca over the time⁵⁹.

These results demonstrate that the exposure of honey bee drones to pesticides such as Fipronil may have negative effects on the fertility of unexposed queens. Furthermore, the situation may be worse in reality, considering

that additive effects may occur if queens are also exposed. Our findings raise questions about the fate of queens fertilized by drones exposed to pesticides and the sustainability of their colonies.

Potential effects on queen offspring. Honey bee colonies exhibit high developmental potential due to the high activity of the queen, which can lay up to 200,000 eggs per year⁴⁵. This high developmental potential is sustained by three main properties of the semen that is stored in the spermatheca of the queen and is linked to the polyandry practices of the queen. (i) The stored semen exhibits genetic diversity due to mating of the queen with as many as 20 drones^{55,60}. This genetic diversity confers an evolutionary advantage that results in enhanced colony fitness via improved adaptation to environmental stressors^{61,62}. (ii) The spermatheca contains a large number of spermatozoa^{20,54,59,60}, and (iii) the spermatozoa exhibit a high viability rate^{20,56,57,59,60}. The latter two properties, which were investigated in this study, are of high importance because they are integral parts of the important egg-laying activity that occurs for several years. Thus, the optimization of worker production relative to the requirements of the colony and the process of swarming to establish a new colony⁴⁵ could be compromised. Because we observed that Fipronil elicits a decrease in both spermatozoa abundance and viability in the queen, Fipronil may have adverse and indirect impacts on queen performance, leading to a decrease in lifespan of the queen and/or in offspring abundance due to altered fertility of the queen.

Queen failure, or supersedure, is a main long-term effect of decreased spermathecal content quality. It is likely that a queen with a smaller number of live spermatozoa does not have the ability to lay fertilized eggs for as long as a queen with a better stock. In addition, a poor spermathecal content could quantitatively and qualitatively modulate the queen's pheromone profile, which could become less attractive for workers, consequently impairing social interactions and colony cohesion⁶³. These processes contribute to anticipated supersedure followed by a critical period during which there is not only an absence of brood production but also a risk that the new queen was killed in nuptial flight or poorly mated, with putative detrimental effects on colony sustainability.

The spermathecal content is also essential for the fertilization of eggs, a process that is poorly understood. It is not known whether queens release exclusively live spermatozoa or a random mixture of live and dead spermatozoa to fertilize eggs. If the queen releases a random mixture of live and dead spermatozoa, the higher abundance of dead spermatozoa in the spermatheca of queens inseminated with semen from drones exposed to Fipronil could lead to a greater proportion of unfertilized eggs laid, resulting in a deficit of worker brood. The probability of having unfertilized eggs, from the exclusive release of dead spermatozoa, is especially important because the queen is economical in terms of sperm use⁶⁴. If the queen releases only live spermatozoa, defects in brood production would potentially result from altered spermatozoa functional and structural integrity, particularly that of membranes or DNA, which have been shown to be affected by oxidative stress in rats after exposure to Fipronil³⁸. DNA damage has also been observed in insect spermatozoa, especially in *Drosophila*, subsequent to a redox homeostasis impairment induced by an environmental stressor⁶⁵. Therefore, it is legitimate to consider that similar effects could occur in honey bee spermatozoa, which exhibited a high reducing potential subsequent to drone exposure to Fipronil; however, further research is required to support this hypothesis. If such a hypothesis is demonstrated in the honey bee, DNA damage could be induced by Fipronil or by its metabolites, leading to DNA modifications that could result in mutations or disrupted epigenetic processes⁶⁶. This assumption is supported by the ability of Fipronil to impact mitochondria^{31,47,48}, which are critical for epigenetic regulation and the response to DNA damage⁶⁷. Following exposure to environmental pollutants, including pesticides, transgenerational effects, such as a decrease in fertility and/or some developmental delays, can affect offspring health over several generations, as observed with unexposed F1 individuals in other insect species^{11,12,68}. Hence, we hypothesize that similar detrimental effects may occur in honey bees. However, more investigations are needed on vertical intercolony transmission, which could also occur via queens carrying DNA modifications (generation \geq F1) and drones issued from these queens. If this assumption was demonstrated for drones, which are haploid with the genetic material of queens because they develop from unfertilized eggs, the transmission of altered genetic material could occur only from F2. Consequently, the indirect effects of pesticides, such as those observed in this study in queens at an individual level, could be extended to the colonial level, even for the colonies and their lines that are never exposed to the original stressor. This mode of pesticide effect transmission could adversely impact the species and explain the decline of honeybees, at least in part. This situation may be worsened by the exposure of honey bee reproducers to a myriad of pollutants, including other pesticides⁶⁹, that can act alone or in synergy⁷⁰, or interact with infectious agents and parasites^{71,72}.

Our findings do not enable the exclusion of effects on a queen's offspring, but they do strongly suggest that poor drone quality leading to poorly-mated queens could be a mechanistic explanation for queen failure. To confirm this assumption, the next step would be to monitor colonies in field conditions after the reintroduction of artificially inseminated queens. An interesting further step would be to evaluate the capability of exposed drones of transmitting their semen in a natural mating context. A strong competition between drones occurs in this context, and the success of drone mating could be studied. Thus, if exposed drones are unable to mate, no altered semen will be present in the spermatheca. However, fertility may be impaired without altered drone vitality, as observed for humans, who exhibit a constant decay in fertility for more than 50 years⁵. Hence, drones with reduced fertility could have equivalent chances of mating as unexposed drones. Thus, if they succeed, the poor semen provided by the exposed drones could be diluted in the spermatheca by healthy semen because honey bee queens mate with up to 20 drones^{55,60} and have an excess of spermatozoa. Consequently, it cannot be excluded that such a mating would result in non-observable effects on the offspring. However, the chances of observing healthy males exhibiting no decreases in fertility might be relatively low. In natural conditions, colonies and consequently drones are exposed to numerous environmental stressors due to the ubiquity of biotic stressors¹³ and chemicals in hives^{73,74}. Therefore, it seems more likely that a generalized decrease in drone fertility would occur and result in an impoverishment of semen stored by queens, as demonstrated with Fipronil, leading to queen failure.

For honey bees, the existence of such fertility impairments, in addition to sublethal effects, at very low levels of exposure, raises the question on the environmental risks generated by the use of systemic pesticides, such as phenylpyrazoles and neonicotinoids. Thus, reproductive disorders induced by agrochemicals on honey bees must be also taken into consideration in the assessment of pesticide risks.

In the context of declining pollinator populations⁷⁵, it would be surprising for reproductive disorders to be restricted to honey bees without affecting other pollinating insects. This reduced fertility could lead to the loss of many species of pollinating insects, which in turn threatens plant reproduction and, consequently, biodiversity. Thus, the disruption of reproductive function by environmental stressors, such as agrochemical pollutants and biological agents, can be regarded as a catalyst of the species extinction phenomenon.

Methods

Experiments were performed in Avignon (France) between early May and late July during 3 consecutive years (2012, 2013 and 2014). To perform the experiments, drones, queens, workers and brood combs were obtained from managed honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). These colonies were treated each year in September with Amitraz to control *Varroa* mite pressure. To evaluate the reproductive toxicity of Fipronil on drones, 4 experiments were conducted (1 in 2012, 2 in 2013 and 1 in 2014). The impact of these exposures on queen reproductive potential was only investigated in summer 2014.

Drone rearing, exposure to Fipronil and food consumption. Twenty-five days before the experiments began, queens of 10 colonies were caged 2 days on drone combs to control drone production (1 comb/colony). One day before drone emergence, the combs were recovered and introduced into the breeder colony with workers. After emergence, a homogeneous set of 300 drones from all brood frames was locked in uniform, queenless colonies that are known to take better care of drones⁷⁶. These newly prepared colonies were composed of 5000 workers, one brood frame, and four empty frames with no food storage to prevent Fipronil dilution in food, as described by Ben Adbelkader *et al.*⁷⁷. These colonies were grown under a tunnel covered with an insect-proof net (two colonies per compartment). For 20 days, in each tunnel compartment, colonies were supplied daily by foragers that could harvest sugar syrup (50% w/v) *ad libitum* from a feeder from 8:30 a.m. to 11:30 a.m.; the syrup was replaced with crushed pollen and water for the remainder of the day⁷⁷. Control and exposed hives were provided sugar syrup (0.1% DMSO) only or sugar syrup contaminated with Fipronil at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.1% DMSO), respectively. Stock solutions of Fipronil (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were used each year and prepared in 1% DMSO for dilution in sugar syrup to a final concentration of 50% sucrose, 0.1% DMSO and 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Fipronil, as confirmed by GC-MS/MS chemical analysis, with a mean value \pm SD of $1.08 \pm 0.11 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 3$).

The amounts of syrup and pollen foraged were measured daily in each compartment, and the evaporation rate was not measured as it was assumed to be identical in all compartments. Thus, during their sexual maturity, drones were chronically fed with a food gathered to the hive by foragers, as in natural conditions. A chemical analysis of the Fipronil and its metabolites in honey stored in exposed hives was performed using GC-MS/MS, and no substances were detected (LOD = 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The set of experiments contained 22 control and 22 exposed colonies (4 and 4 in 2012, 6 and 6 for the first experiment in 2013, 4 and 4 for the second experiment in 2013, and 8 and 8 in 2014). At the end of the experiments, i.e., 20 days, the drones were captured for semen collection.

Drone survival rate, maturity rate and semen collection. Drones were exposed to Fipronil from emergence. After 20 days of exposure, coinciding with their sexual maturity, drones from each colony were caught, and the survival rate was recorded. Semen was subsequently collected immediately with a glass capillary tube connected to a syringe filled with Kiev solution (36 g/L trisodium citrate, 3.6 g/L sodium bicarbonate, 0.6 g/L potassium chloride, 5 g/L glucose, 3 g/L sulfanilamide, pH 8.5, osmotic pressure 460 mOs/mL)⁷⁷.

For each hive, semen from different drones was pooled in the same capillary tube. During semen collection, the maturity rate of drones from each colony was assessed by the ability to provide sperm after stimulation. The average semen volume per drone was also determined, considering the number of drones providing semen and the total volume collected measured in calibrated glass capillary tubes. The spermatozoa concentration, mortality rate and metabolic activity (as assessed by measuring the reducing potential and adenosine triphosphate (ATP) content) in fresh semen were assessed. In 2014, semen samples from exposed and control drones were used to inseminate two groups of sister queens.

Characterization of semen quality. 1) *Spermatozoa concentration.* Fresh semen was diluted (1:1500) in Kiev solution before the spermatozoa were counted under a phase-contrast microscope using a cell counter (Neubauer improved/Petroff). For each sample, 5 counting iterations were performed to determine an average value.

2) *Mortality rate of spermatozoa.* The spermatozoa mortality rate was determined using a conventional dead cell stain, propidium iodide, from the LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Molecular Probes L-7011) as recommended by the supplier. Briefly, samples of diluted semen were analyzed by fluorimetry (FI $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) in triplicate in a 96-well black microplate in a TECAN infinite F500 plate reader. Each well contained 100 μL of diluted semen in Kiev solution containing 1×10^7 spermatozoa and 60 μM propidium iodide. Before reading the fluorescence, the microplate was incubated in the dark for 10 min at 34 °C. Spermatozoa mortality was determined as a percentage from the fluorescence intensity using a standard range up to 1×10^7 dead spermatozoa obtained by successive freezing and thawing.

3) *Reducing potential in sperm.* The reducing potential was determined using a Prestoblue kit (Invitrogen), in which resazurin is reduced by cell metabolic activity. Semen was analyzed in triplicate using a 96-white-well

microplate and a TECAN infinite F500 plate reader. Each well contained 90 μ L of diluted semen in Kiev solution containing 1×10^7 spermatozoa and 10 μ L of Prestoblue. Before reading the absorbance at 570 nm, the microplate was incubated in the dark for 10 min.

4) *ATP content in sperm.* ATP content was determined using an ATPlite kit from PerkinElmer in the same wells used to assess the reducing potential, as recommended by the manufacturer and described by Ben Abdalkader *et al.*⁷⁷.

Queen rearing and instrumental insemination. In 2014, in parallel with the exposure experiment, queens were reared for instrumental insemination (at 8 days old) one week after drone semen collection. To obtain sister queens, young larvae (less than 24 h) from a single brood frame were grafted in artificial queen cell cups fixed to a frame and were subsequently introduced in a strong breeder colony. Two days before queen emergence, the queen cells and wax were fixed on top of Type Pain cages. Thirty newborn bees were also introduced in each cage to assist and feed the queens. Sucrose syrup (50% w/v), crushed pollen and water were given *ad libitum* to the bees. Cages were incubated at 34 °C and 60% RH until the queens reached sexual maturity for insemination with semen from capillary tubes previously stored in the dark at 21 °C, which is consistent with beekeeping practices. However, in another experiment, we verified that a storage period of 2 weeks in these experimental conditions did not alter sperm viability. This result is in accordance with those of previous studies^{78,79}. In addition, the viability of spermatozoa was assessed one day prior to insemination. Before insemination, each queen received two 10-min CO₂ treatments to simulate mating flight for better sperm acceptance and to contribute to the initiation of oviposition⁷⁶. The first CO₂ treatment was performed the day before insemination, and the second was performed on the day of insemination. The queens (40 per modality) were instrumentally inseminated with 8 μ L of semen from control or exposed drones, corresponding to about 9.5 drones per queen. Newly inseminated queens were then placed in their respective cages with 30 new emerging bees and housed in the incubator for up to 2 weeks before analysis. After this period, the queens began to lay eggs regardless of modality.

Characterization of spermatozoa stored in spermatheca. Fourteen days after insemination, of the 40 queens inseminated by each modality, 28 control queens inseminated with semen of unexposed drones and 30 queens inseminated with semen of exposed drones were still alive and were analyzed. Most deaths occurred a few days after insemination and may be attributable to injuries inflicted during the procedure. Queens were individually weighed and dissected in phosphate-buffered saline solution (PBS) to remove the spermatheca. After removal, the spermatheca was crushed in 500 μ L of PBS to release spermatozoa and obtain a sperm suspension. The number of spermatozoa stored in the spermatheca and their mortality rate were determined.

1) *Number of spermatozoa.* The spermatozoa suspension was diluted (1:3) in Kiev buffer to count the spermatozoa under a phase-contrast microscope using a cell counter (Neubauer improved/Petroff). For each spermatheca, 5 counting iterations were performed to determine an average value.

2) *Spermatozoa mortality rate.* The spermatozoa mortality rate was determined using a Vita-Eosin kit (RAL Diagnostics) adapted for honey bee sperm. Briefly, 10 μ L of spermatozoa suspension was incubated with 60 μ L of eosin stain for 5 min at ambient temperature, followed by the addition of 20 μ L of nigrosine stain. Two smears were made on independent slides and observed under a phase-contrast microscope. Dead spermatozoa, which were permeable to the eosin stain, were stained pink, whereas live spermatozoa remained white with purple-bordered contours due to nigrosine. From each smear, at least 200 spermatozoa were observed to determine the number and percentage of live and dead spermatozoa in each spermatheca.

3) *Living spermatozoa in spermatheca.* The living spermatozoa in the spermatheca corresponded to the difference between the total number of spermatozoa stored in the spermatheca and the number of dead spermatozoa.

Statistical analyses. The following analyses were performed using the lme4 package of R software⁸⁰.

1) Statistical analyses of worker bee-foraging performance were performed in two phases: first, in by modeling foraging performance over time with a non-linear logistic function with two parameters (α = instantaneous growth rate of foraging, β = maximum quantity of cumulated forage); and second, by applying a generalized linear mixed model to the parameters α and β with a Gaussian distribution, setting identity as the link function and the year of the experiment as a random effect.

2) In the same way, a generalized linear mixed model was applied to analyze the effects of Fipronil on drone and fertility parameters.

3) The difference in queen weight between the control and treated subsets was estimated by t-test after confirming normality. A generalized linear mixed model (random distribution with identity as the link function and hive from which the sperm capillaries originated as a random effect) was used to evaluate the significance of spermatozoa stored in spermatheca and the relationships among drone semen characteristics and spermathecal content. No random effect was observed for the hive from which the sperm capillaries originated.

References

1. Ceballos, G. *et al.* Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* **1**, e1400253, doi: 10.1126/sciadv.1400253 (2015).
2. IUCN. Red list of threatened species. Version 2015.4 (IUCN, 2015, www.iucnredlist.org).
3. Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)* **347**, 1255957, doi: 10.1126/science.1255957 (2015).
4. Wilcove, D. S., Rothstein, D., Dubow, J., Phillips, A. & Losos, E. Quantifying threats to imperiled species in the United States. *Bioscience* **48**, 607–615, doi: 10.2307/1313420 (1998).

5. Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* **305**, 609–613, doi: 10.1136/bmj.305.6854.609 (1992).
6. Multigner, L. & Oliva, A. Environment as a risk factor for male infertility. *ScientificWorldJournal* **1**, 576–578, doi: 10.1100/tsw.2001.296 (2001).
7. Tyler, C. R., Jobling, S. & Sumpter, J. P. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* **28**, 319–361, doi: 10.1080/10408449891344236 (1998).
8. McCallum, M. L. *et al.* Endocrine disruption of sexual selection by an estrogenic herbicide in the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Ecotoxicology (London, England)* **22**, 1461–1466, doi: 10.1007/s10646-013-1132-3 (2013).
9. Misra, S. *et al.* Identification of *Drosophila*-based endpoints for the assessment and understanding of xenobiotic-mediated male reproductive adversities. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* **141**, 278–291, doi: 10.1093/toxsci/kfu125 (2014).
10. Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* **52**, 81–106, doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440 (2007).
11. Xiao, D., Yang, T., Desneux, N., Han, P. & Gao, X. Assessment of Sublethal and Transgenerational Effects of Pirimicarb on the Wheat Aphids *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *PLoS One* **10**, e0128936, doi: 10.1371/journal.pone.0128936 (2015).
12. Bingsohn, L., Knorr, E. & Vilcinskas, A. The model beetle *Tribolium castaneum* can be used as an early warning system for transgenerational epigenetic side effects caused by pharmaceuticals. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP* **185–186**, 57–64, doi: 10.1016/j.cbpc.2016.03.002 (2016).
13. Neumann, P. & Carreck, N. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* **49**, 1–6, doi: 10.3896/ibra.1.49.1.01 (2010).
14. vanEngelsdorp, D. & Meixner, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, S80–S95, doi: 10.1016/j.jip.2009.06.011 (2010).
15. vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M. & Pettis, J. A survey of Honey Bee colony losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS One* **3**, e4071, doi: 10.1371/journal.pone.0004071 (2008).
16. Brodschneider, R., Moosbeckhofer, R. & Craillsheim, K. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. Apic. Res.* **49**, 23–30, doi: 10.3896/ibra.1.49.1.04 (2010).
17. Genersch, E. *et al.* The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* **41**, 332–352, doi: 10.1051/apido/2010014 (2010).
18. Camazine, S. *et al.* How healthy are commercially-produced US honey bee queens? *Am. Bee J.* **138**, 677–680 (1998).
19. Collins, A. M. & Pettis, J. S. Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* **44**, 351–356, doi: 10.1007/s13592-012-0186-1 (2013).
20. Williams, G. R. *et al.* Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Sci. Rep.* **5**, doi: 10.1038/srep14621 (2015).
21. Sandrock, C. *et al.* Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS One* **9**, e103592, doi: 10.1371/journal.pone.0103592 (2014).
22. Chaimanee, V., Evans, J. D., Chen, Y., Jackson, C. & Pettis, J. S. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Physiol.* **89**, 1–8, doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.03.004 (2016).
23. Alaux, C. *et al.* Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **106**, 380–385, doi: 10.1016/j.jip.2010.12.005 (2011).
24. Gauthier, L. *et al.* Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS One* **6**, e16217, doi: 10.1371/journal.pone.0016217 (2011).
25. Rhodes, J. & Somerville, D. *Introduction and Early Performance of Queen Bees: Some Factors Affecting Success: a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation.* (Rural Industries Research and Development Corporation, 2003).
26. Burley, L. M., Fell, R. D. & Saacke, R. G. Survival of honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J. Econ. Entomol.* **101**, 1081–1087, doi: 10.1093/jee/101.4.1081 (2008).
27. Collins, A. M. & Pettis, J. S. Effect of varroa infestation on semen quality. *Am. Bee J.* **141**, 590–593 (2001).
28. Peng, Y., Baer-Imhoof, B., Millar, A. H. & Baer, B. Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Sci. Rep.* **5**, 10565, doi: 10.1038/srep10565 (2015).
29. Bonmatin, J. M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. R.* **22**, 35–67, doi: 10.1007/s11356-014-3332-7 (2015).
30. Levot, G. W. & Somerville, D. Efficacy and safety of the insecticidal small hive beetle refuge trap APITHOR (TM) in bee hives. *Australian Journal of Entomology* **51**, 198–204, doi: 10.1111/j.1440-6055.2011.00852.x (2012).
31. Nicodemou, D. *et al.* Fipronil and Imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 2070–2075, doi: 10.1002/etc.2655 (2014).
32. Roat, T. C. *et al.* Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. *Archives of environmental contamination and toxicology* **64**, 456–466, doi: 10.1007/s00244-012-9849-1 (2013).
33. Colin, M. E. *et al.* A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental contamination and toxicology* **47**, 387–395, doi: 10.1007/s00244-004-3052-y (2004).
34. Decourtye, A. *et al.* Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. *Julius-Kühn-Archiv.* **423**, 75–83 (2010).
35. El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M. & Armengaud, C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **82**, 30–39, doi: 10.1016/j.pbb.2005.07.008 (2005).
36. Zaluski, R., Kadri, S. M., Alonso, D. P., Martins Ribolla, P. E. & de Oliveira Orsi, R. Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 1062–1069, doi: 10.1002/etc.2889 (2015).
37. Pisa, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental science and pollution research international* **22**, 68–102, doi: 10.1007/s11356-014-3471-x (2015).
38. Khan, S., Jan, M. H., Kumar, D. & Telang, A. G. Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* **124**, 8–14, doi: 10.1016/j.pestbp.2015.03.010 (2015).
39. Sun, L. W. *et al.* Effects of trilostane and fipronil on the reproductive axis in an early life stage of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology (London, England)* **23**, 1044–1054, doi: 10.1007/s10646-014-1248-0 (2014).
40. Kitulagodage, M., Buttemer, W. A. & Astheimer, L. B. Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. *Ecotoxicology (London, England)* **20**, 653–660, doi: 10.1007/s10646-011-0605-5 (2011).
41. Alves, P. R. L., Cardoso, E., Martines, A. M., Sousa, J. P. & Pasini, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere* **90**, 2674–2682, doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046 (2013).
42. Chandler, G. T. *et al.* Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 117–124, doi: 10.1897/03-124 (2004).
43. Vannette, R. L., Mohamed, A. & Johnson, B. R. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci. Rep.* **5**, 16224, doi: 10.1038/srep16224 (2015).

44. EFSA. Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). 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, 275, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2668 (2012).
45. Winston, M. L. *The Biology of the Honeybee*. (Harvard University Press, 1987).
46. Ruttner, F. In *Traité de Biologie de l'Abeille* (ed R. Chauvin) 145–185 (Masson et Cie, 1968).
47. Vidau, C., Brunet, J.-L., Badiou, A. & Belzunces, L. P. Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol. In Vitro* 23, 589–597, doi: 10.1016/j.tiv.2009.01.017 (2009).
48. Vidau, C. *et al.* Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* 32, 935–943, doi: 10.1016/j.neuro.2011.04.006 (2011).
49. Zhang, B. Y. *et al.* Fipronil induces apoptosis through caspase-dependent mitochondrial pathways in *Drosophila* S2 cells. *Pestic. Biochem. Physiol.* 119, 81–89, doi: 10.1016/j.pestbp.2015.01.019 (2015).
50. Ki, Y. W., Lee, J. E., Park, J. H., Shin, I. C. & Koh, H. C. Reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase induce apoptotic death of SH-SY5Y cells in response to fipronil. *Toxicol. Lett.* 211, 18–28, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.022 (2012).
51. Weirich, G. F., Collins, A. M. & Williams, V. P. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33, 3–14, doi: 10.1051/apido:2001001 (2002).
52. Gessner, B. & Ruttner, F. Transfer of spermatozoa into spermatheca of honey bee queen. *Apidologie* 8, 1–18, doi: 10.1051/apido:19770101 (1977).
53. Baer, B. Sexual selection in *Apis* bees. *Apidologie* 36, 187–200, doi: 10.1051/apido:2005013 (2005).
54. Cobey, S. W. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38, 390–410, doi: 10.1051/apido:2007029 (2007).
55. Woyke, J. Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World* 43, 21–25 (1962).
56. Gencer, H. V. & Kahya, Y. The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *J. Apic. Res.* 50, 190–194, doi: 10.3896/ibra.1.50.3.02 (2011).
57. Collins, A. M. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31, 421–429, doi: 10.1051/apido:2000132 (2000).
58. Poland, V. *et al.* Stored sperm differs from ejaculated sperm by proteome alterations associated with energy metabolism in the honeybee *Apis mellifera*. *Molecular ecology* 20, 2643–2654, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05029.x (2011).
59. Lodesani, M., Balduzzi, D. & Galli, A. A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera* ligustica) queen spermathecae. *J. Apic. Res.* 43, 27–28, doi: 10.1080/00218839.2004.11101105 (2004).
60. Tarpay, D. R., Keller, J. J., Caren, J. R. & Delaney, D. A. Assessing the Mating 'Health' of Commercial Honey Bee Queens. *J. Econ. Entomol.* 105, 20–25, doi: 10.1603/eci1276 (2012).
61. Tarpay, D. R. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 270, 99–103, doi: 10.1098/rspb.2002.2199 (2003).
62. Oldroyd, B. P. & Fewell, J. H. Large fitness benefits from polyandry in the honey bee, *Apis mellifera*. *Trends. Ecol. Evol.* 23, 59–60, doi: 10.1016/j.tree.2007.10.012 (2008).
63. Richard, F. J., Tarpay, D. R. & Grozinger, C. M. Effects of insemination quantity on Honey Bee queen physiology. *PLoS One* 2, e980, doi: 10.1371/journal.pone.0000980 (2007).
64. Baer, B., Collins, J., Maalaps, K. & den Boer, S. P. A. Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecol. Evol.*, doi: 10.1002/ece3.2075 (2016).
65. Brennan, L. J., Haukedal, J. A., Earle, J. C., Keddie, B. & Harris, H. L. Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of Wolbachia-infected *Drosophila simulans*. *Insect molecular biology* 21, 510–520, doi: 10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x (2012).
66. Soubry, A., Hoyo, C., Jirtle, R. L. & Murphy, S. K. A paternal environmental legacy: Evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. *Bioessays* 36, 359–371, doi: 10.1002/bies.201300113 (2014).
67. Shaughnessy, D. T. *et al.* Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environ. Health Perspect.* 122, 1271–1278, doi: 10.1289/ehp.1408418 (2014).
68. Tassou, K. T. & Schulz, R. Low field-relevant tebufenozide concentrations affect reproduction in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in a long-term toxicity test. *Environmental science and pollution research international* 20, 3735–3742, doi: 10.1007/s11356-012-1311-4 (2013).
69. Johnson, R. M. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434, doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162005 (2015).
70. Glavan, G. & Božič, J. The synergy of xenobiotics in honey bee *Apis mellifera*: mechanisms and effects. *Acta Biol. Slov.* 56, 11–27 (2013).
71. Aufaivre, J. *et al.* Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 326, doi: 10.1038/srep00326 (2012).
72. Sanchez-Bayo, F. *et al.* Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environment international* 89–90, 7–11, doi: 10.1016/j.envint.2016.01.009 (2016).
73. Mullin, C. A. *et al.* High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5, e9754, doi: 10.1371/journal.pone.0009754 (2010).
74. Chauzat, M. P. *et al.* An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 103–111, doi: 10.1002/etc.361 (2011).
75. Potts, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.* 25, 345–353, doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007 (2010).
76. Ruttner, F. *The instrumental insemination of the queen bee*. (Apimondia, 1976).
77. Ben Abdalkader, F. *et al.* Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45, 215–223, doi: 10.1007/s13592-013-0240-7 (2014).
78. Locke, S. J. & Peng, Y. S. The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.* 18, 144–148, doi: 10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x (1993).
79. Collins, A. M. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *J. Econ. Entomol.* 93, 568–571 (2000).
80. Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48, doi: 10.18637/jss.v067.i01 (2015).

Acknowledgements

Special thanks to D.G. Biron for useful advice in the preparation of this manuscript. Thanks to Yannick Poquet and Fanny Mondet for technical help and assistance. This study was supported in part by the European Community program for French beekeeping coordinated by the French Ministry of Agriculture (FranceAgriMer agreement 11-42R), Région PACA, the department "Santé des Plantes & Environnement" of the French National Institute for Agricultural Research (INRA), and Apiculture Remuaux Sud-Est company.

Author Contributions

G.K., B.P., S.T., L.P.B. and J.-L.B. designed the experiments; G.K., S.T., F.B.A., M.B., M.C., B.P., P.B., J.S. and J.-L.B. performed experiments; G.K. and A.K. performed the data analyses and statistical analyses; and G.K., L.P.B. and J.-L.B. wrote the paper. All authors have reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Kairo, G. *et al.* Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci. Rep.* **6**, 31904; doi: 10.1038/srep31904 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Bilan

Cette étude a permis de mettre en évidence les effets reprotoxiques du Fipronil vis-à-vis de l'abeille domestique. Ainsi, une atteinte de la fertilité des faux-bourçons induite par l'insecticide a eu pour conséquence une baisse du potentiel reproducteur des reines. Ces résultats suggèrent fortement que la défaillance des reines, se traduisant par une diminution de leur longévité et de la qualité du couvain produit, pourrait-être expliquée, du moins en partie, par une diminution de la fertilité des mâles. Cependant, les effets à l'échelle coloniale restent à être démontrés. Des études avaient été initiées dans ce sens. Des reines inséminées avec des semences de faux-bourçons exposés au Fipronil avaient été introduites au sein de colonies orphelines. Ces introductions s'étaient conclues par un échec se traduisant par un rejet systématique des reines et ce, toutes modalités confondues. Ces rejets ont été attribués au fait que les conditions d'introduction n'étaient pas optimales. Ainsi, les colonies n'avaient pas été orphelinées assez tôt pour faciliter l'acceptation, erreur due à un manque de connaissances sur la biologie comportementale des abeilles. Face à ces échecs, la décision avait été prise d'investiguer les effets d'une exposition des mâles sur les reines en analysant le contenu de leur spermathèque qui a abouti aux résultats de la présente étude.

D'autres interrogations concernant le succès d'accouplement des mâles exposés et leur capacité à transmettre à la reine leur semence de mauvaise qualité sont aussi à prendre en considération. En effet, il peut être envisagé que des mâles exposés, en concurrence avec des mâles non exposés, soient désavantagés dans le cadre de la compétition acharnée qui s'opère pour féconder les reines en conditions naturelles. Ainsi, la possibilité que dans un environnement donné, des mâles ne soient exposés à aucun stress est peu probable. Dans, la réalité les mâles sont exposés, au sein des colonies, à de nombreux stress environnementaux tels que les agents infectieux et les polluants chimiques. De ce fait, des approches multi-stresseurs sont à privilégier dans l'appréhension des troubles de la reproduction.

2. Effets d'une association toxicopathologique sur la physiologie des mâles

Avant-propos

Suite à la mise en évidence des effets reprotoxiques du Fipronil vis-à-vis des mâles d'abeilles, des interrogations sont apparues concernant les effets d'une association de stressseurs, et plus particulièrement d'une association de type toxicopathologique, sur leur physiologie générale. Ainsi, nous avons entrepris d'évaluer les effets d'une infection par la microsporidie entomopathogène *Nosema ceranae* associée ou non à une exposition chronique à l'insecticide Fipronil. Les microsporidies sont des parasites intracellulaires ubiquitaires dans l'environnement ayant la capacité de détourner l'ATP des cellules qu'elles infectent (Williams 2009). Chez l'abeille, les nosémoses induites par le parasite *Nosema ceranae* entraînent un stress énergétique (Mayack and Naug 2009) pouvant en partie être responsable de l'affaiblissement voire de la disparition de certaines colonies d'abeilles (Higes et al. 2010). De plus, les associations de ce parasite avec l'insecticide Fipronil ont montré, en conditions de laboratoire, des effets synergiques sur les ouvrières se traduisant par des effets létaux, dans le cas de l'association, avec une sensibilisation réciproque d'un stressseur à l'action de l'autre stressseur (Vidau et al. 2011, Aufauvre et al. 2012). Ainsi, à partir des résultats observés sur les ouvrières et les modes d'action du parasite et du pesticide sur le métabolisme énergétique, l'hypothèse avait été émise que cette association de stressseurs pouvait également induire des effets synergiques sur la physiologie des mâles dont la fertilité.

Ces travaux ont abouti à la réalisation d'un article soumis :

« *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology »

Guillaume Kairo, David G. Biron, Faten Ben Abdelkader, Marc Bonnet, Sylvie Tchamitchian, Marianne Cousin, Claudia Dussaubat, Boris Benoit, André Kretzschmar, Luc P. Belzunces, Jean-Luc Brunet

Résumé

L'abeille domestique est menacée par des agents biologiques et des pesticides pouvant agir indépendamment les uns des autres ou de façon combinée pour induire des effets additifs voire synergiques sur sa physiologie et son espérance de vie. Si des effets synergiques d'une combinaison parasite/pesticide ont été mis en évidence chez les ouvrières et les reines, aucune étude n'avait été conduite sur les mâles à ce sujet. Pourtant, les faux-bourçons apportent, de toute évidence, une contribution essentielle au développement et la pérennité de la colonie de par la qualité et la diversité des semences qu'ils transmettent à la reine lors des accouplements. Ainsi, les effets du parasite *Nosema ceranae* et du pesticide Fipronil ont été étudiés sur des traits d'histoire de vie des mâles et sur des marqueurs physiologiques analysés dans différents compartiments biologiques (tête, intestin, abdomen et semence). En conditions semi-contrôlées, des faux-bourçons ont été infectés par le parasite ou exposés chroniquement pendant 20 jours à l'insecticide ou exposés aux deux stressés combinés. Sans considérer dans un premier temps les aspects de fertilité, les individus sexuellement matures présentaient des troubles physiologiques différents selon le facteur de stress rencontré. La microsporidie seule a induit des effets modérés et localisés dans l'intestin. Le Fipronil seul a induit des effets modérés et généralisés à tout l'organisme. La combinaison parasite/pesticide a montré des effets importants et généralisés avec des effets synergiques non seulement sur la physiologie mais aussi sur la survie pouvant altérer le succès d'accouplement des individus affectés. En considérant les aspects de fertilité, les semences produites ont été fortement affectées quel que soit le traitement suggérant une importante sensibilité de la fonction de reproduction des faux-bourçons à de nombreux facteurs de stress. Ces résultats suggèrent que des altérations de la santé et de la fertilité des mâles pourraient être la cause de reines pauvrement accouplées conduisant au stockage dans la spermathèque de semences d'une qualité et d'une diversité appauvries. Ainsi, les nombreux cas de défaillance des reines, observés ces dernières années, pourraient être la conséquence d'une exposition continue et simultanée des mâles à des myriades de stressés environnementaux.

Article 3 : *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination
compromise honey bee reproduction via changes in male
physiology

Nosema ceranae, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology

Short title: Parasite/Pesticide interaction on drones

Authors:

G. Kairo¹, D. G. Biron², F. Ben Abdelkader^{1,3}, M. Bonnet¹, S. Tchamitchian¹, M. Cousin¹, C. Dussaubat⁴, B. Benoît¹, A. Kretzschmar⁴, L. P. Belzunces¹, J.-L. Brunet^{1*}

Affiliations:

¹INRA, UR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, CS 40509, 84914 Avignon Cedex 9, France

²CNRS, UMR CNRS Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, 63177 Aubière Cedex, France

³INAT, Laboratoire de Zoologie et d'Apiculture, 1082 Tunis, Tunisie

⁴INRA, UR 546 Biostatistiques & Processus Spatiaux, CS 40509, 84914 Avignon, France

*Correspondence to: jean-luc.brunet@inra.fr

Abstract:

The honey bee is threatened by biological agents and pesticides that can act alone or in combination to induce synergistic effects on their physiology and lifespan. The synergistic effects of a parasite/pesticide combination have been demonstrated on workers and queens, but no studies have been performed on drones despite their essential contribution to colony sustainability by providing semen diversity and quality. The effects of a *Nosema ceranae*/Fipronil combination on life traits and physiological markers including the drone head, midgut, abdomen and semen were examined. Drones were infected with microsporidia and/or chronically exposed to the insecticide for 20 days in semi-field conditions. Following exposure from emergence to sexual maturity, different physiological effects on the drone body were observed based on the administered stressor. Microsporidia alone induced moderate and localized effects in the midgut, whereas Fipronil alone induced moderate and generalized effects. The parasite/insecticide combination synergized to drastically affect both physiology and survival, with an important and generalized action, challenging mating success. In terms of fertility, semen was strongly impacted regardless of stressor, suggesting that drone reproductive functions are very sensitive to stress factors. These findings suggest that drone health and fertility impairment might contribute to poorly mated queens, leading to the storage of poor semen quality and poor spermathecae diversity. Thus, the queen failure observed in recent years might result from the continuous exposure of drones to multiple environmental stressors.

Keywords: honey bee, drone, pesticides, parasites, interaction, physiology, fertility, synergy

Introduction

Through reproduction, sexual species have the ability to respond to environmental stressors in their habitats by producing adapted offspring. However, pollutants and biological agents might threaten sexual reproduction. For instance, in humans, some fungi, bacteria, viruses and parasites (1-3), as well as xenobiotics, such as endocrine disruptors and pesticides, cause fertility impairment in individuals of both sexes (4-6). Similar impairments have been observed more broadly in wildlife, including vertebrates and invertebrates (7-9). In insects, reproductive disorders induced by environmental stressors can result in fertility decline (10-21), a change in reproductive behavior, such as choice of sexual partner(s) and mating success (22, 23), and diverse effects on offspring production and physiology (10, 24-29).

The effects of numerous stressors on the health of organisms have gained increasing interest because of possible impacts not only on animal health but also on ecosystem function (30, 31). Among various stressors, the combined effects of pollutants and simultaneous infection by parasites on host health are of primary concern (30, 31). Depending on the stressor combination, joint effects can be antagonistic, additive or synergistic. A synergistic interaction is defined as a combination of stressors that results in a greater effect than the cumulative expected effect from independent exposure (32). The synergistic interaction of chemicals combined with natural stressors has been studied on aquatic organisms, such as *Daphnia* and *Artemia* (30, 33), and more recently on the honey bee (34-41). Co-exposure might induce additive or synergistic effects, as shown in honey bee workers (34-37, 39) and queens (40). However, the drone caste has not been examined despite evidence that reproductive disorders can lead to species weakening. These disorders have rarely been suggested to explain the pollinator decline that has been observed worldwide, particularly in the decline of bee populations exposed to stressors (42, 43). The honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), is a valuable host model to study the ecological and evolutionary dynamics of host/parasite/pesticide interactions in eusocial insects because of its economic value, genetic diversity, available data on its biology and parasites, and pioneer studies on honey bee/parasite/pesticide interactions.

The honey bee, a species reported to be declining in the Northern hemisphere (44, 45), has a singular mode of reproduction that uses a haplodiploid sex determination system and polyandry. Thus, at an early stage of its life, a young diploid queen mates with up to 20

haploid drones in specific sites called drone congregation areas, where fierce competition occurs due to a highly male-biased sex ratio (46, 47). Following mating, a small proportion of the spermatozoa received from each drone migrates into spermatheca to be used by the queen to fertilize eggs throughout her life (46, 47). The diversity of sperm stored, a result of the polyandry, enables high intra-colonial genetic diversity that enhances survival, fitness, productivity and resilience to environmental disturbances (48-50). Moreover, sperm diversity plays an important role, but sperm quality is also extremely important because drone semen quality determines spermathecal content, which is closely linked to queen reproductive potential (20). Thus, a drone is a key individual at the origin of a cascade of events required for colony growth and sustainability. However, although drones are key to colony health, the effects of drone exposure to environmental stressors have been poorly investigated. Some studies, mostly focused on the effects of Varroa mites and mite treatments, have shown that drone survival (51-53), fertility (11, 12, 54) and mating behavior (12) are impacted. More recently, studies have shown that other environmental stressors, such as the microsporidium *Nosema apis* (18), and systemic insecticides, such as neonicotinoids (55) and Fipronil (20), might also affect drone survival and/or fertility.

To study the effects of pathogen/pesticide co-exposure, we exposed drones in semi-field conditions from emergence to sexual maturity to the microsporidia *Nosema ceranae*, which is suspected to be a major cause of honey bee decline in Southern Europe (56), and/or the insecticide Fipronil, which is known to impair drone fertility (20), (Fig. 1). We wanted to know whether this combination induced synergistic effects in male honey bees as has been previously reported in workers (35, 36). In this case, the effects on drones were assessed with an original approach examining drone fertility, life traits and primary physiological functions (neural, metabolic, immune, detoxification and antioxidant functions) using a battery of physiological markers in different biological compartments (see Materials and Methods section for more details, Fig. 1 and Table 1). These physiological markers were chosen for their relevance to assess the effects of anthropogenic pollutants (41, 57-59), biological agents (34, 60), and nutritional deficiency (60) on honey bee physiology and were quantified in the head, abdomen, midgut, and semen. We then discuss the implication of these results on honey bee reproduction as well as their consequences on queen impoverishment, which leads to queen failure and is suspected to be a major cause of colony loss in winter (61-63).

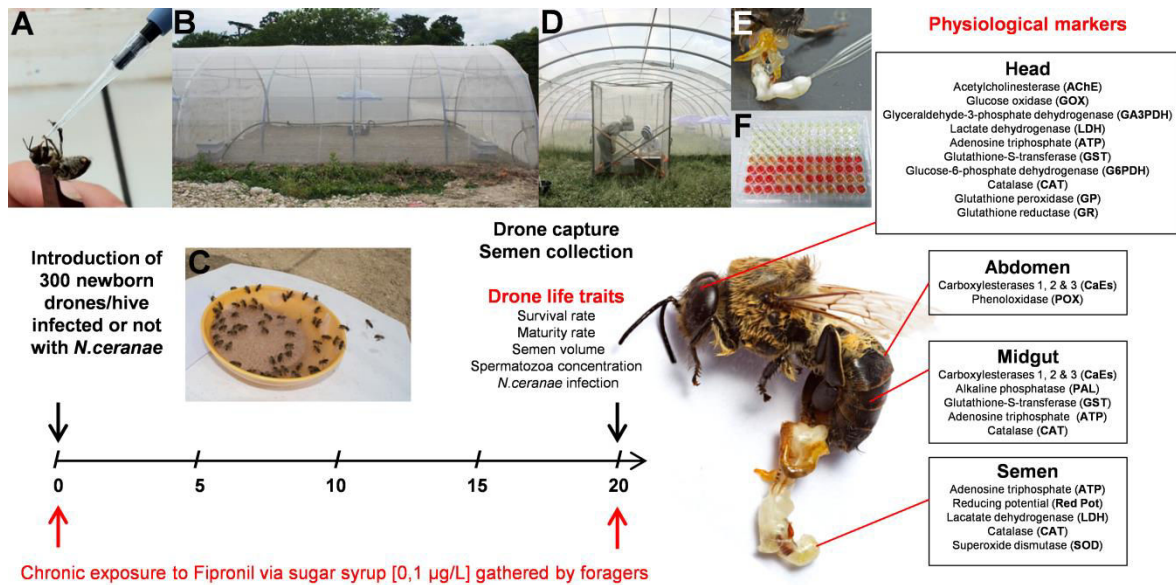


Fig. 1. Experimental design

Drones were exposed to the pathogen *N. ceranae*, the insecticide Fipronil or both under semi-field conditions. Newborn drones were individually fed a sugar syrup solution contaminated with 50 000 spores of *N. ceranae* (A) and cloistered in a queenless colony placed under a tunnel covered with an insect-proof net (B). For 20 days, colonies were supplied daily by foragers that gathered in a feeder with contaminated sugar syrup solution with Fipronil at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (C). At the end of the experiment, drones were caught (D) to collect semen in a glass capillary (E). Following the exposures, drone life traits were investigated, and analyses of physiological markers in the head, abdomen, midgut and semen were performed (F).

Results

Drone life history traits

The survival and sexual maturity rates of drones, the semen volume per drone, the spermatozoa concentration in semen and the level of *N. ceranae* contamination were recorded at the end of a 20 days exposure period. For survival and maturity rates, semen volume and spermatozoa concentration, no significant differences were observed ($n = 4$ per modality, Fig. 2), although in some cases, trends seemed to emerge. For the *N. ceranae*/Fipronil interaction, the survival rate dropped from approximately 70% to 40%, suggesting a synergistic effect (Fig. 2A). Moreover, although maturity rate and semen volume were not affected (Fig. 2B and 2C), the spermatozoa concentration decreased by approximately 20% for the *N. ceranae*, Fipronil and *N. ceranae*/Fipronil combination groups (Fig. 2D). Finally, the infection level of 20 day-old drones with *N. ceranae* ($n = 12$ per modality) revealed a parasite load of approximately 30×10^6 spores per individual for the *N. ceranae* and *N. ceranae*/Fipronil stressors ($P < 0.001$ in both case, Fig. 2E). The

control and Fipronil groups exhibited a parasite load of approximately 40 000 spores. Furthermore, no *N. ceranae* spores were observed in drone sperm, which contrasts with the sperm contamination observed in drones of similar age exposed to *N. apis* (18).

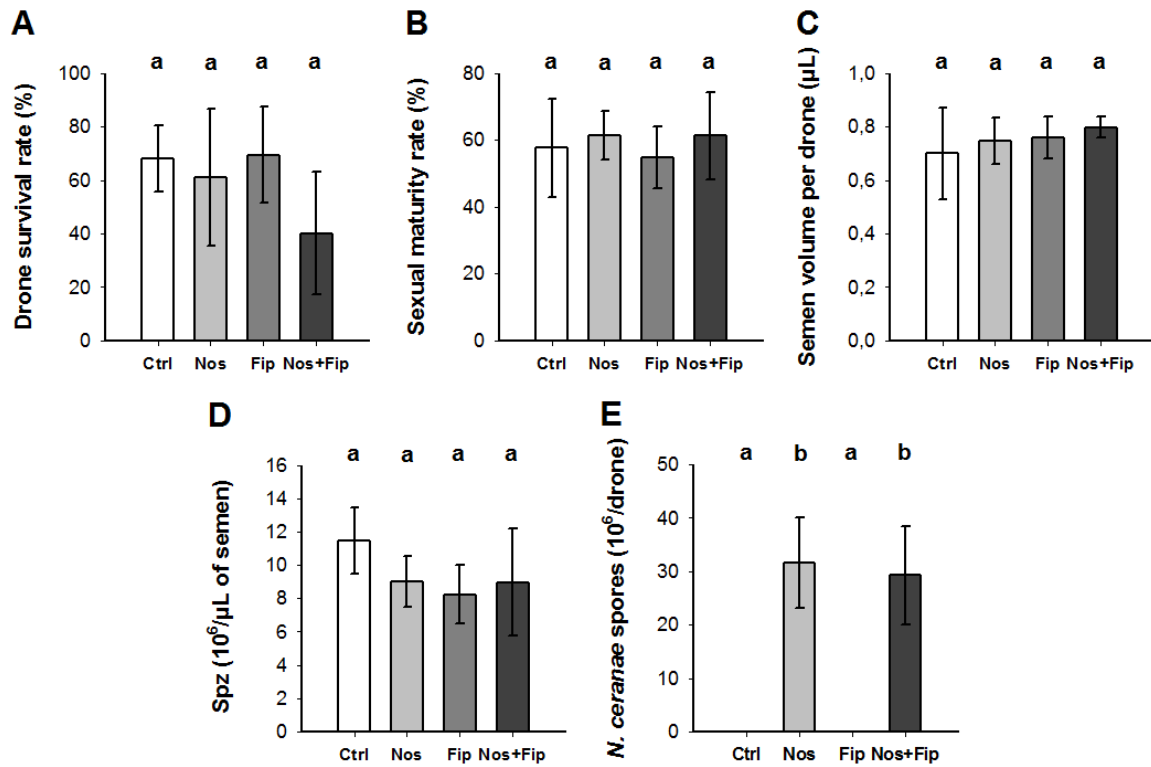


Fig. 2. Effects of the stressors, alone or combined, on drone life traits

The effects of the pathogen and the insecticide alone or in combination were studied at the individual level. The survival rate (A), the sexual maturity rate (B), the semen volume per drone (C) and the spermatozoa concentration (D) were measured for each hive (n = 4 for each stressor modality). The level of *N. ceranae* infection (E) was determined using 3 samples of 5 drones per hive (n = 12 for each modality of treatment). The data represent the mean values ± standard deviations. Statistical analyses were performed using a post-hoc Wilcoxon test for the first four parameters (A-D). A generalized linear mixed model was applied to the level of *N. ceranae* infection (E) considering a random effect of the hives from which the drones came. Significant differences at $P \leq 0.05$ between modalities are expressed with different letters.

Physiological markers in individual drones

Various physiological markers were tested in three biological compartments (head, midgut, and abdomen). These markers are linked to one or more key physiological functions related to the immune system (glucose oxidase (GOX), phenoloxidase (POX) and alkaline phosphatase (ALP)), the xenobiotic detoxification system (glutathione-S-transferase (GST) and carboxylesterases 1, 2 & 3 (CaEs)), antioxidant defense (GST,

glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP), glutathione reductase (GR)), neural activity (acetylcholinesterase (AChE)) or metabolism (G6PDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH), lactate dehydrogenase (LDH), adenosine triphosphate (ATP), CaE 1, CaE 2, CaE 3, GST) (Table 1).

Physiological marker	Tissue	unit	Physiological functions	Physiological markers responses (Mean \pm SD)			
				Control	<i>Nosema ceranae</i>	Fipronil [0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Nos + Fip [0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
AChE	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	neural	253.9 \pm 30.2 a	235.9 \pm 35.0 ab	221.2 \pm 27.0 b ↘	226.7 \pm 15.8 b ↘
GOX	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	immune	32.3 \pm 14.6 a	32.1 \pm 13.5 a	34.0 \pm 18.7 a	30.5 \pm 18.7 a
GA3PDH	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic	325.1 \pm 54.3 a	334.5 \pm 41.1 ab	336.7 \pm 39.6 ab	391.8 \pm 41.1 b ↗
LDH	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic	46.5 \pm 4.0 a	46.0 \pm 3.8 a	52.5 \pm 5.2 b ↗	53.0 \pm 3.4 b ↗
ATP	head	UL.mg of tissue ⁻¹	metabolic	11117.6 \pm 1023.4 a	11779.2 \pm 900.8 ab	11171.3 \pm 587.7 a	12421.8 \pm 823.2 b ↗
GST	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification. antioxidant	252.3 \pm 26.5 a	253.2 \pm 28.1 a	232.8 \pm 23.0 ab	228.3 \pm 15.2 b ↘
G6PDH	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. antioxidant	7.8 \pm 0.7 a	7.2 \pm 1.3 a	7.2 \pm 1.0 a	7.1 \pm 0.9 a
CAT	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	antioxidant	139.5 \pm 51.9 a	164.3 \pm 58.4 ab	158.1 \pm 99.0 ab	244.9 \pm 54.7 b ↗
GP	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	antioxidant	24.9 \pm 4.4 a	25.0 \pm 4.4 a	31.0 \pm 6.3 b ↗	32.8 \pm 5.2 b ↗
GR	head	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	antioxidant	20.4 \pm 5.6 a	21.6 \pm 4.4 a	23.1 \pm 3.9 ab	26.0 \pm 4.9 b ↗
CaE-1	abdomen	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	316.6 \pm 66.4 a	275.5 \pm 39.4 a	265.8 \pm 32.8 a	294.4 \pm 54.4 a
CaE-2	abdomen	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	518.9 \pm 48.3 a	523.8 \pm 29.4 a	501.9 \pm 32.6 a	506.2 \pm 24.5 a
CaE-3	abdomen	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	70.0 \pm 14.8 a	66.9 \pm 8.1 a	68.7 \pm 9.56 a	72.6 \pm 15.2 a
POX	abdomen	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	immune	2.1 \pm 0.8 a	2.5 \pm 1.0 a	3.3 \pm 0.7 b ↗	3.3 \pm 0.6 b ↗
CaE-1	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	910.7 \pm 172.3 a	913.2 \pm 134.0 a	1003.0 \pm 140.7 a	993.8 \pm 115.5 a
CaE-2	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	536.5 \pm 94.3 ab	521.5 \pm 119.2 a	607.1 \pm 61.8 b	577.8 \pm 66.7 ab
CaE-3	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification	209.2 \pm 49.3 a	211.6 \pm 42.0 a	260.5 \pm 45.2 b ↗	280.8 \pm 37.4 b ↗
ALP	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	immune	19.4 \pm 5.6 ac	14.0 \pm 4.7 b ↘	20.5 \pm 6.4 c	16.0 \pm 5.5 ab
ATP	midgut	UL.mg of tissue ⁻¹	metabolic	23798.2 \pm 7663.7 a	28557.6 \pm 12897.7 a	22123.8 \pm 9941.7 a	22613.4 \pm 9276.1 a
GST	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	metabolic. detoxification. antioxidant	203.3 \pm 39.7 a	204.4 \pm 37.1 a	222.0 \pm 25.0 a	254.3 \pm 27.7 b ↗
CAT	midgut	mUA.min ⁻¹ .mg of tissue ⁻¹	antioxidant	1154.8 \pm 315.6 a	1414.8 \pm 208.4 bc ↗	1345.4 \pm 330.8 ab	1606.4 \pm 313.8 c ↗

Table 1: Effects of the stressors, alone or combined, on physiological markers in drones

A multiple markers approach was performed to study the effects of the stressors in the head, midgut and abdomen of drones. Each marker was associated with one or more of the main physiological functions (neural, metabolic, immune, detoxification and antioxidant). The data represent the mean values \pm standard deviations of the physiological markers responses expressed in milliUnits of Absorbance (mUA) or in Luminescence Intensity (LI) for ATP. Three samples of 6 drones were measured from each hive (n = 12 for each modality of treatment). For statistical analyses, a generalized linear mixed model was applied considering a random effect of the hives from which the drones came. Significant differences at $P \leq 0.05$ between modalities are expressed with different letters. Red arrows indicate the direction of the modulation relative to the control group.

In drones infected with *N. ceranae*, significant effects were only observed in the midgut for ALP ($P = 0.018$) and CAT ($P = 0.025$); ALP was decreased, whereas CAT was increased. These results suggest changes to immune defenses, antioxidant activity, and metabolism. After sublethal chronic exposure to Fipronil, significant effects on the drones were observed in all compartments and on five physiological functions studied. AChE was negatively regulated ($P = 0.017$), whereas LDH, GP, POX and CaE 3 increased ($P = 0.012$, $P = 0.04$, $P = 0.007$ and $P = 0.004$, respectively). Finally, the changes observed from each stressor alone were also observed for the *N. ceranae*/Fipronil combination except for ALP. In the midgut, compared to each stressor alone, CAT and CaE 3 changes were enhanced with the combination of stressors, appearing to generate synergistic effects ($P = 0.0012$ and $P \leq 0.001$, respectively). Moreover, six additional physiological markers were significantly affected by the stressor combination, which also suggest synergistic effects: GA3PDH ($P = 0.038$), ATP ($P = 0.017$), GST in head ($P = 0.045$), GST in midgut ($P < 0.0001$), CAT in head ($P = 0.049$), and GR ($P = 0.01$). Interestingly, GST was increased in the midgut and decreased in the head, indicating tissue-dependent regulation of the synergetic effect (Table 1).

Cluster analysis of the physiological markers showed a tendency of replicates to group according to the stressor administered to the honey bee drones (Fig. 3A). The clusters are more homogeneous for controls and the stressor combination (*N. ceranae*/Fipronil). Principal component analysis (PCA) provides a visual representation of the physiological states of drones exposed to different stressors (Fig. 3B-D) and discriminated all of the treatments (Fig. 3B). Moreover, the *N. ceranae*/Fipronil stressor was clearly distinct from the control. In the head and midgut, physiological makers linked to metabolism, antioxidant defenses and detoxification systems appeared to have the largest influence distinguishing the physiological state of drones according to the stressor experienced (Fig. 3C). The statistical analyses performed on the values of the two main axes of the PCA showed a significant difference between Fipronil and the control and between *N. ceranae*/Fipronil and all of the other treatments (Fig. 3D).

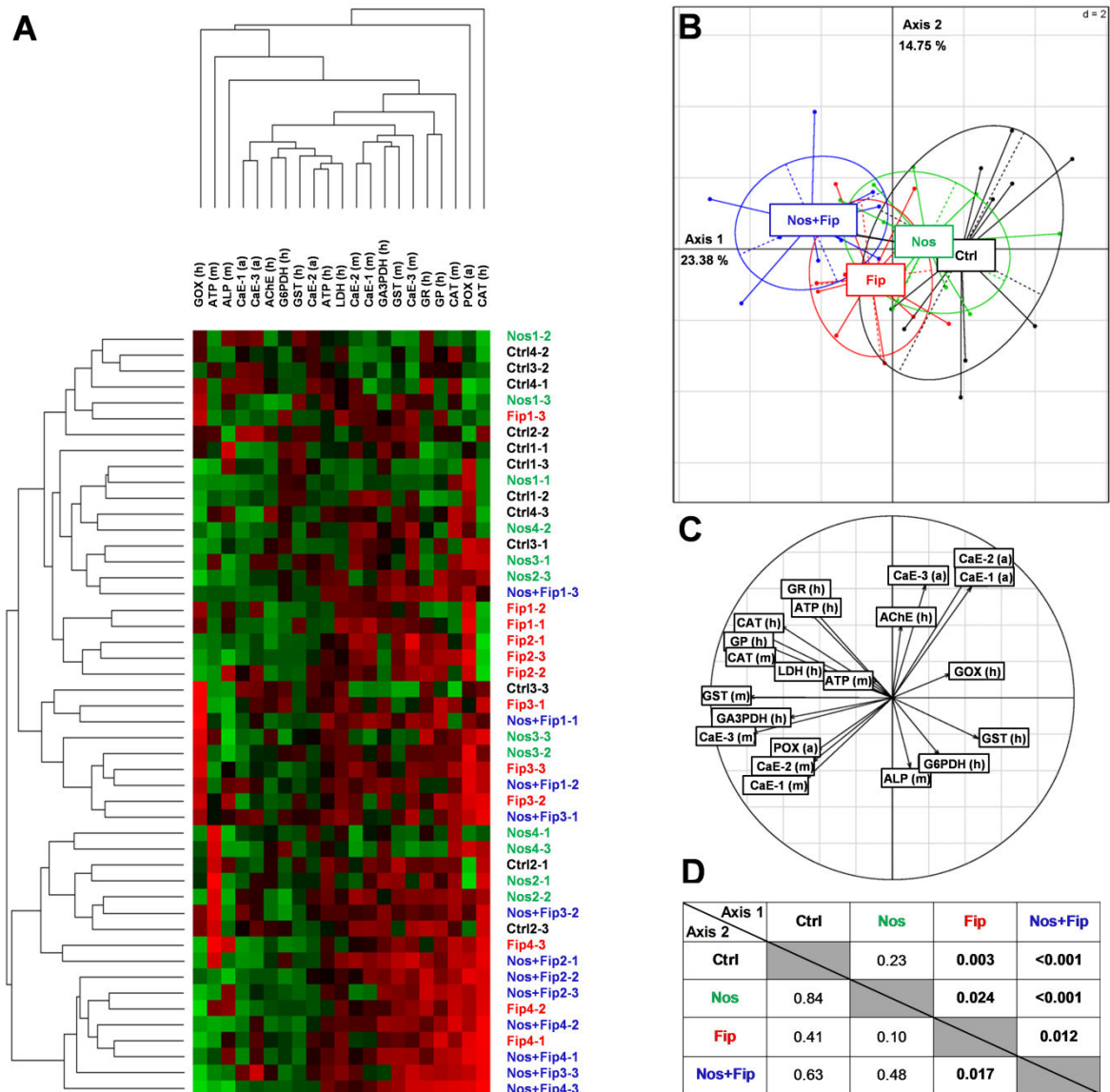


Fig. 3. Effects of the stressors, alone or combined, on the physiological state of drones

According to stressor, the cluster (A) and the principal component analyses (B) show a global approach of changes to the physiological markers in the head (h), midgut (m) and abdomen (a) of drones. A color code is assigned to each treatment: “black” for the control group (Ctrl), “green” for the *N. ceranae* group (Nos), “red” for the Fipronil group (Fip), and “blue” for the *N. ceranae*/Fipronil group (Nos+Fip). In the cluster analysis, the first number refers to the hive, and the second refers to the sample. The correlation circle (C) indicates the significance of the markers in the PCA representation. For statistical analysis, a post-hoc Wilcoxon test was applied to the values of the two main axes of the PCA. *P* values are indicated in the table (D).

Physiological markers for fertility in drone sperm

Physiological markers were studied in semen. Each marker is linked to one key physiological function (CAT, superoxide dismutase (SOD) for antioxidant ability and LDH, ATP and reducing potential (Red Pot) for metabolism) (Fig. 4, for more details see Materials and Methods section). In response to *N. ceranae* infection, significant effects were only observed in the Red Pot of drone sperm (Fig. 4A, $P \leq 0.05$), and positive CAT changes were observed in spermatozoa (Fig. 4D). After sublethal chronic exposure to Fipronil, significant positive changes were observed in sperm for Red Pot and ATP values as well as for CAT in spermatozoa ($P \leq 0.05$ in both cases). Finally, for the *N. ceranae*/Fipronil interaction, a significant positive change was only observed for CAT in spermatozoa (Fig. 4D, $P \leq 0.05$). However, positive tendencies for Red Pot (Fig. 4A) and LDH (Fig. 4C) were observed in seminal fluid. Interestingly, no changes to spermatozoa ATP levels were measured, (Fig. 4B). In seminal fluid, no SOD changes (Fig. 4E) were observed, in contrast to CAT activity in spermatozoa (Fig. 4D), suggesting a compartment-dependent response to oxidative stress.

Integrative analysis of all physiological markers

Here, in Cluster and PCA analyses, all of the compartments (head, midgut, abdomen, sperm, seminal fluid, and spermatozoa) and all of the physiological markers were used to compare the effects of different modalities. Samples from three out of four stressor groups (*i.e.* Control, Fipronil, *N. ceranae*/Fipronil) were grouped. Interestingly, *N. ceranae* samples maintained heterogeneous distribution in the total cluster, which has been previously observed (Fig. 5A). Additionally, integrative PCA clearly discriminated between all of the stressors with significant differences between all of the groups (Fig. 5B-D). Interestingly, physiological parameters measured in semen and those measured in the head and midgut linked to metabolism, antioxidant defenses and detoxification systems were the key physiological markers explaining the separation of the experimental groups (Fig. 5C).

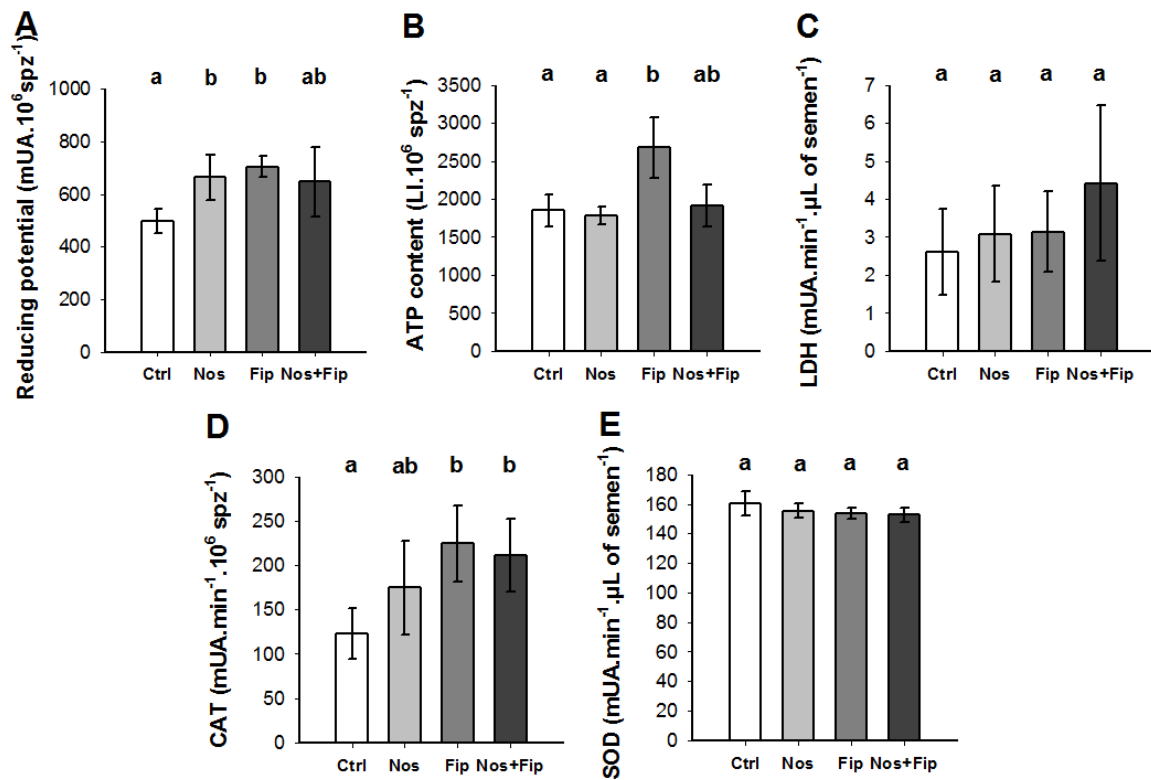


Fig. 4. Effects of the stressors, alone or combined, on physiological markers in semen

Physiological markers were studied in semen. The reducing potential (A) and ATP content (B) in semen and the LDH activity in seminal fluid (C) were measured to assess the effects of each treatment on sperm metabolism. The CAT activity in spermatozoa (spz) (D) and the SOD activity in seminal fluid (E) were measured to assess the antioxidant response. The data represent the mean values \pm standard deviations of the parameters expressed in milliUnits of Absorbance (mUA) for Red Pot, LDH, CAT and SOD, or in Luminescence Intensity (LI) for ATP ($n = 4$ for each modality of treatment). Statistical analyses were performed using a post-hoc Wilcoxon test. Significant differences at $P \leq 0.05$ between modalities are expressed with different letters.

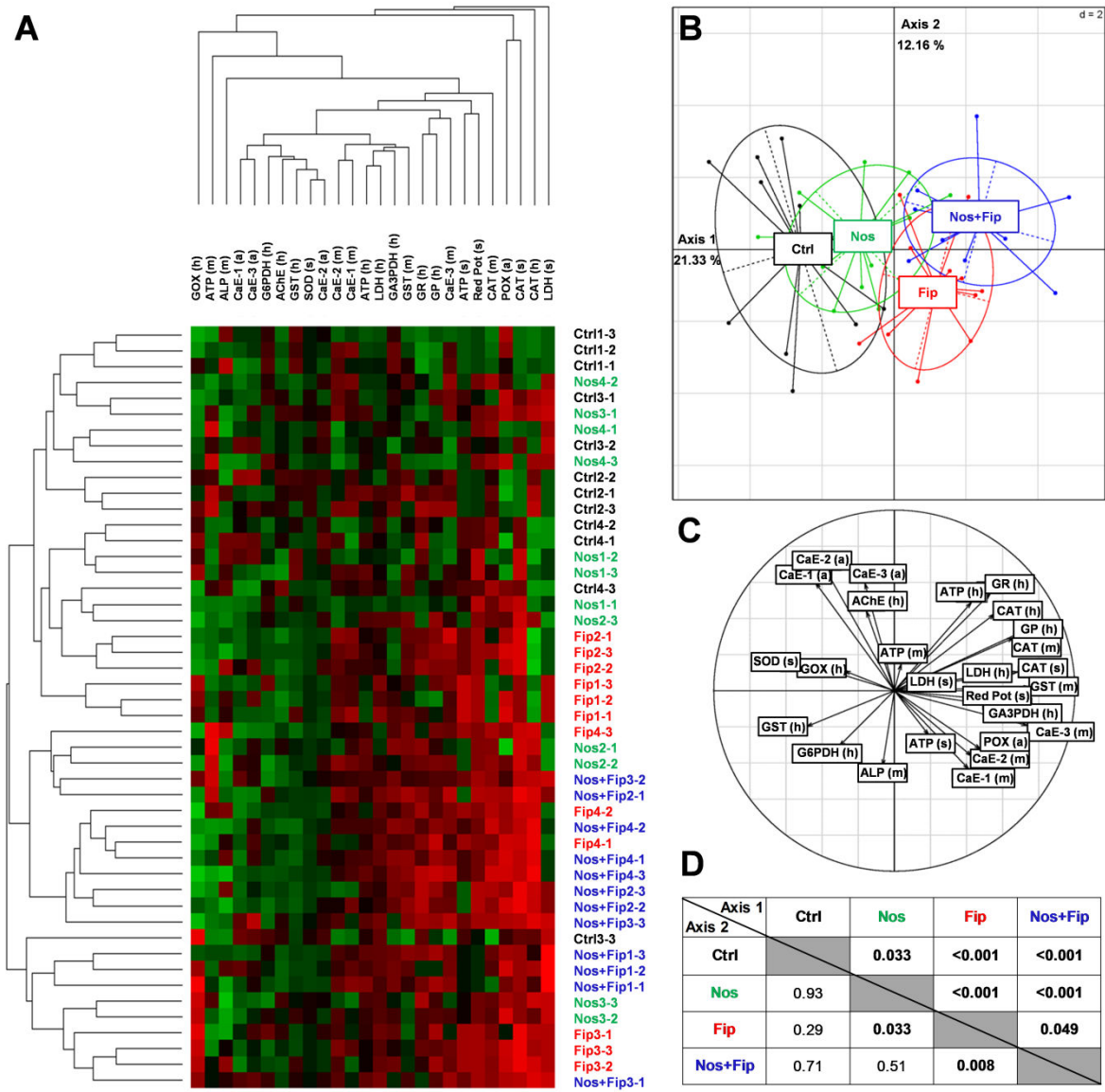


Fig. 5. Effects of the stressors, alone or combined, on the physiological state of drones including semen

The cluster (A) and the Principal Component Analyses (B) show an integrative approach to assess the physiological markers studied in the head (h), midgut (m), abdomen (a) and semen (s) of drones. A color code is assigned to each treatment: “black” for the control group (Ctrl), “green” for the *N. ceranae* group (Nos), “red” for the Fipronil group (Fip), and “blue” for the *N. ceranae*/Fipronil group (Nos+Fip). In the cluster analysis, the first number refers to the hive, and the second refers to the sample. The correlation circle (C) indicates the significance of the markers in the PCA representation. For statistical analysis, a post-hoc Wilcoxon test was applied on the values of the two main axes of the PCA. *P* values are indicated in the table (D).

Discussion

In ecosystems of the biosphere, each environmental stressor has the ability to disturb organisms from the molecular to population level. The effects can range from small cellular changes to the death of individuals and might include behavioral and reproductive disorders. However, in ecosystems, organisms are seldom exposed to only one abiotic or biotic stressor and are often exposed simultaneously to several environmental stressors. In combination, these stressors can elicit different types of effects, including additive, synergistic and antagonistic effects (30, 32). Based on previous studies of honey bee workers exhibiting a synergistic effect from the pathogen/insecticide association *N. ceranae*/Fipronil, we hypothesized that a synergetic effect might also occur in reproductive castes, particularly drones, which have a critical role in the life cycle of a honey bee colony. Indeed, drones have a key role ensuring genetic diversity via polyandry and also control semen quality, which the queen's reproductive success depends on (20, 48-50). Thus, survival, mating success and semen quality are key criteria whose integrity must be preserved in honey bee colonies. To this end, individuals possess a cellular arsenal (immune, detoxification, and antioxidant systems) to respond to biotic and abiotic stress factors or combinations of these factors. Thus, effects of the *N. ceranae*/Fipronil combination on the drones were investigated from the physiological to the phenotypic level following the exposure of drones, in a semi-controlled environment, from emergence to sexual maturity.

According to the effects on the life history traits and physiological parameters at the individual scale, without considering semen, differential action of the stressors, which was moderate and limited to the midgut for *N. ceranae* and very important and widespread for the *N. ceranae*/Fipronil (Table 1, Fig. 2 & 3), was observed. Exposure to *N. ceranae* induced a strongly localized response in the midgut by interfering with immunity and defenses against oxidative stress without affecting the metabolism (Table 1). These localized disturbances might be explained by the fact that *N. ceranae* is a honey bee parasite specific to intestinal cells that disrupts the homeostasis of the digestive system (56) by hijacking the ATP of the host midgut epithelium (64) and by affecting its defense mechanisms (38, 56, 65). However, although males showed disturbances in defense systems, physiological markers showed no effects on metabolism, particularly ATP level. In any case, the survival of drones (Fig. 2A) was not engaged, as has already been observed in honey bee strains tolerant to *N. ceranae* (66) but not in strains susceptible to

N. apis (18) and *N. ceranae* (66). Moreover, the heterogeneity of drone response to the microsporidia, as observed in cluster analysis (Fig. 3A), potentially explaining the presence of individuals exhibiting different levels of pathogen tolerance, which might explain the moderate global impact of infection on the overall physiological state of drones (Fig. 3B-D). Regarding chronic exposure to insecticide, all of the studied major physiological functions (metabolism, nervous system, immune system, detoxification system and defenses against oxidative stress) were disturbed in all of the biological compartments. However, Fipronil and *N. ceranae* do not impact the same physiological marker, which is revealed as specificity in the mode of action of the two stressors (Table 1). In the honey bee, Fipronil is known to disturb cellular metabolism (20, 41, 67), the nervous system (68, 69), detoxification system (41, 58) and immunity (38, 69) and to elicit changes in the antioxidant system (58) that are linked to the production of reactive oxygen species, as in other organisms (70). The general effect of the insecticide on drones reveals systemic properties in the honey bee like in other animals (71) and in plants (72). However, despite the general effect, survival does not appear to be affected at this level of foraged food contamination as recently observed by Kairo et al. (20). Nevertheless, when considering (i) previous studies showing the ability of Fipronil to alter the cognitive functions of workers (73-77), (ii) AChE changed in drones (i.e., the enzyme involved in the cholinergic synapses) (Table 1) and (iii) the weakening of individuals, revealed by the generalized physiological disturbances (Table 1, Figs. 3B-D), it is legitimate to think that exposure to Fipronil might alter a drone's ability to compete with non-exposed congeners in the drone congregation area and to mate with the queen. Upon co-exposure (*N. ceranae*/Fipronil), the effects induced by *N. ceranae* and Fipronil alone were also observed but in some cases were increased. In addition, 6 new markers were modulated, confirming the synergistic effects of the interaction (Table 1, Fig. 3). Thus, the overall physiological state of individuals exposed to the combined stressors was different from that of individuals in the other groups and was completely distinct from that of the control individuals (Figs. 3B-D). These results might explain the excess drone mortality upon co-exposure to *N. ceranae* and Fipronil that was clearly observed in honey bee workers (35, 36). Under the co-exposure conditions of this study, the adverse impact was not limited to a failure in mating success, as mentioned above for Fipronil, but in cases in which survival is committed, they might be extended to a drone population drop in congregation areas. This drop in drone population could result in a lower selective pressure

and, in turn, in the mating of drones that are less vigorous and less adapted to their habitats. This scenario would reinforce the assumptions highlighting a decrease of healthy drones to explain the lower quality of queens observed in apiaries (54, 78, 79). Thus, even if fertility aspects are not considered, impairments of male integrity could lead to poor queen quality and, consequently, could be sufficient to alter the development of “daughter colonies”.

Regarding fertility, the results suggest that semen quality is impacted regardless of stressor. These changes result in metabolic disturbances and affect oxidative stress defense, which were both physiological functions studied in sperm (Fig. 4). Interestingly, the physiological damage induced by both stressors at the individual level was also observed in the sperm. Moreover, each stressor had a significant impact on fertility parameters whereas at the individual level, differential effects occur. This finding was supported by an integrative analysis of all of the measured physiological markers (individuals including semen) showing that all of the groups can be clearly distinguished (Fig. 5). The fact that males exposed to *N. ceranae* exhibit a different physiological state from all of the other groups (control, Fipronil and the combination of *N. ceranae*/Fipronil) suggests that reproductive functions are more sensitive to stressors compared than other studied functions. Regardless of stressor, fertility impairment is observed at the phenotypic level, with a decline in sperm concentration of approximately 20%, whereas the maturity and semen volume of the drones are not affected (Figs. 2B-D). Although these results are not statistically significant and only a trend for an effect has emerged, in the case of Fipronil, the results are highly consistent with those of a previous study clearly showing the effects of insecticide on both sperm concentration and metabolism with similar disorders (20). Thus, whatever the nature of the stress factor considered in this study at the individual level, semen quality appears altered in the same way. Hence, even if queens were not affected by a shortage of drones able to mate, they would likely be affected by the poor quality of the semen received. This finding suggests that these effects influence not only the reproductive success of a queen, as has been observed with males exposed to Fipronil, but also the offspring (20).

In conclusion, this study is the first in the available literature that shows the additive and synergistic effects of an insecticide/pathogen combination (*N. ceranae*/Fipronil) on the males of a eusocial insect species. Similar effects have been shown on the survival and physiology of drones but not on their fertility. Indeed, the results have shown effects on sperm quality regardless of stress factor applied (*N. ceranae*

and Fipronil alone or in combination). Consequently, the high sensitivity of fertility parameters suggests that reproduction could be one of the first functions of drones affected in stressful conditions. As a result, stresses exerted alone might not affect the vitality and survival of individuals but could have many effects on reproductive functions. All of the changes observed in the drones and/or their fertility can have serious consequences on the life cycle of an *A. mellifera* colony. Even if the physical integrity of the drone were preserved, allowing him normal behavior and unchanged mating success, damage would result by transmitting poor quality semen, affecting not only queen performance but also the offspring. If the physiology of drones is strongly impacted to jeopardize their survival, mating performance might be compromised and lead to a shortage of healthy males in congregation areas. This might lead to poorly mated queens related to decreased selection pressure and/or a potential loss of genetic diversity, which would be largely detrimental to the species. This study highlights the need to study the effects of stress factor combinations on fertility problems in the honey bee as one of the mechanistic explanations for queen failure. This study also highlights the need for a multi stressor approaches when studying reproductive disorders affecting many species in the biosphere.

Materials and Methods

Experimental design

Drones were exposed to the insecticide Fipronil and/or the pathogen *N. ceranae* under semi-field conditions in Avignon (South France) between early June and late July of 2012. Drones were reared from emergence to sexual maturity for 20 days in queenless colonies placed in compartmented tunnels covered with an insect-proof net. Homogeneous batches of 300 drones were cloistered in queenless colonies containing 5000 workers, 1 brood comb and 5 empty combs for food storage according to a previously described protocol (20, 80). Drones, worker bees and brood combs needed for the study were obtained from honey bee colonies that were monitored for their sanitary status and specially checked for the absence *Nosema* spp. infection.

***N. ceranae* experimental infection and exposure to Fipronil**

To test the effects of *N. ceranae*/Fipronil interaction on drones, 4 experimental groups of 4 queenless colonies each were established: the control group (Ctrl), a group infected with *N. ceranae* (Nos), a group exposed to Fipronil (Fip) and a group both infected with *N. ceranae* and exposed to Fipronil (Nos+Fip). Before introduction to queenless colonies, emerging drones were individually fed 2 μ L sugar syrup (50%, w/v) with or without 50000 spores of *N. ceranae*, which is a realistic infectious load (81) (Fig. 1A). Fresh spores were isolated from forager bees of local colonies naturally infected with the microsporidium (34). Confirmation of the species *N. ceranae* was performed by standard PCR (34). Under the tunnel, colonies were daily supplied by foragers that collected sugar syrup, crushed pollen and water in feeders outside the colony (Fig. 1B and C). The sugar syrup (50%, w/v, 0.1% DMSO) with or without Fipronil at the relevant environmental concentration of 0.1 μ g.L⁻¹ (82) was provided daily from 8:30 a.m. to 11:30 a.m. Crushed pollen and water were available for the remaining time (20). Thus, drones were chronically exposed to the insecticide in the hive via food gathered by foragers mimicking natural exposure conditions. Twenty days after introduction, the surviving drones were caught (Fig. 1D), and the endophallus was manually everted to collect semen in a glass capillary using an insemination syringe (83) (Fig. 1E). Fresh drone semen samples from the same colony were pooled in a glass capillary and kept at 21°C in the dark until analysis the next day. Drone bodies were frozen immediately at -80°C after semen collection for further analysis. Thus, the effects induced by *N. ceranae*, Fipronil and the combination of both stressors were investigated from the drone life traits to the main physiological functions using physiological markers linked to neural, metabolic, detoxification, antioxidant and immune functions (Fig. 1, Table 1).

In this study, it was difficult to perform a large number of measurements because (i) the protocol required the individual feeding of 4800 newborn drones to expose them to the microsporidium, (ii) fertility and physiological parameters required a large volume of semen, and a mature drone produces less than 1 μ L, and (iii) some parameters, such as survival rate, can only be measured at the colony level.

Drone life traits

After 20 days of exposure in the hive, drone life traits such as survival, maturity, infection with *N. ceranae*, semen volume and spermatozoa concentration were investigated. The drone survival rate was estimated by counting the remaining surviving drones. The maturity rate of drones was assessed by measuring the number of drones able to provide sperm after stimulation, and the overall semen volume per colony was determined during the semen collection process. The average semen volume per drone was calculated from the two previous parameters. The semen concentration was estimated by counting spermatozoa under a phase contrast microscope using a Neubauer improved/Petroff counting cell. Semen was diluted (1:1500) in Kiev solution (36 g/L trisodium citrate, 3.6 g/L sodium bicarbonate, 0.6 g/L potassium chloride, 5 g/L glucose, 3 g/L sulfanilamide, pH 8.5, osmotic pressure 460 mOs/mL) (20) and counted in triplicate. For each of these previous parameters, one measure per colony was obtained and four colonies were investigated (n = 4 for each modality). To determine the level *N. ceranae* infection in 20 day-old drones, 3 samples of 5 drones per hive were analyzed (n = 12 for each modality). Briefly, abdomens were crushed in distilled water, and the resulting suspension was filtered. The spore concentration of the suspension was determined using a Malassez counting cell (34).

Analysis of physiological markers

To study the effects of different stressors on drone physiology, enzymatic and non-enzymatic markers were measured in the head, midgut, abdomen and semen (Fig. 1, Table 1). Thus, the activities of AChE, GOX, GA3PDH, G6PDH, GP and GR were measured in the head. Activities of POX, ALP and SOD were measured in the abdomen devoid of midgut, midgut and spermatozoa, respectively. The ATP content was measured in the head, midgut and semen, and the Red Pot was also measured in semen. GST activity was measured in the head and midgut. LDH activity was measured in the head and diluted seminal fluid. CAT activity was measured in the head, midgut and spermatozoa, and CaEs were measured in the midgut and abdomen (Fig. 1, Table 1). In the head, midgut and abdomen, 3 samples of 6 drones each were analyzed per hive (n = 12 for each modality). For semen, one measure per colony was performed (n = 4 for each modality). For each sample, each biological parameter was determined in triplicate with an infinite® F500 plate reader from TECAN (Lyon, France) (Fig. 1F).

Sample preparation

For assays in the head, midgut and abdomen, the tissue from 6 drones was homogenized in lysis buffer [10 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, protease inhibitors (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ antipain, leupeptin and pepstatin A, 25 units $\cdot\text{mL}^{-1}$ aprotinin and 0.1 mg $\cdot\text{mL}^{-1}$ soybean trypsin inhibitor), 40 mM sodium phosphate, pH 7.4] to obtain a 10% (w/v) extract (84). Tissues were homogenized with a Tissue-Lyser II (Qiagen®) homogenizer for 5 periods of 10 s at 30 Hz separated by an interval of 30 s. After 10 min, the homogenization procedure was repeated a second time. The homogenate was centrifuged for 20 min at 15 000 g, and the supernatant was used to analyze enzymes activities and non-enzymatic compounds in the biological compartments. For enzymatic assays in semen, the semen was diluted in an equal volume of Kiev solution and centrifuged for 20 min at 16 000 g to separate spermatozoa and seminal fluid (85). The supernatant, corresponding to seminal fluid, was recovered to measure LDH and SOD activities. The pellet, corresponding to spermatozoa, was rinsed twice by suspension in Kiev solution, centrifuged and recovered. Then, the pellet was diluted 10% (v/v) in lysis buffer to lyse the spermatozoa. The cellular debris were removed by centrifugation for 15 min at 15 000 g before measuring CAT activity. All of the procedures were performed at 4°C. Unlike enzymatic activity measurements, the ATP content and the reducing potential were measured in non-separated semen at room temperature.

Acetylcholinesterase (AChE)

AChE is a neural enzyme involved the controls nerve transmission by hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine in the synapse. Head AChE activity was determined, spectrophotometrically at 412 nm in reaction medium containing 0.3 mM acetylthiocholine iodide (AcSch.I), 1.5 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) and 100 mM sodium phosphate (Na_3PO_4) pH 7.0 according to the method of Ellman et al. (86) modified by Belzunces et al. (84).

Glucose oxidase (GOX)

GOX catalyzes the oxidation of D-glucose into D-gluconic acid and hydrogen peroxide (H_2O_2), which has antimicrobial properties. Excreted in honey by salivary glands, this enzyme is involved in the social immunity of honey bees. Head GOX was assayed by assessing the oxidation of o-dianisidine by H_2O_2 at 430 nm. The reaction medium

contained 100 mM glucose, 2.5 Units/200 μ L peroxidase, 0.3 mM o-dianisidine and 125 mM potassium phosphate pH 7.0 (34).

Phenol oxidase (POX)

POX plays a role in the individual immunity of insects through the melanization process involved in tissue regeneration and encapsulation of foreign bodies, such as pathogens. Abdomen POX activity was determined by following the conversion of 3, 4-dihydroxy-L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) into melanin at 490 nm. The reaction medium contained 20 mM NaCl, 0.4 mg.mL⁻¹ L-DOPA and 10 mM sodium phosphate (NaH₂PO₄) pH 7.2 (34).

Alkaline phosphatase (ALP)

ALP plays an important role maintaining the homeostasis of gut tissues due to its involvement in many metabolic processes linked to immune responses. The midgut PAL dephosphorylating activity was monitored by the conversion of p-nitrophenyl phosphate p-NPP) into p-nitrophenol at 410 nm. The reaction medium contained 20 μ M magnesium chloride (MgCl₂), 2 mM p-NPP and 100 mM Tris-HCl pH 8.5 (87).

Carboxylesterases 1, 2 & 3 (CaEs)

CaEs are involved in numerous metabolic and detoxification processes. Midgut and abdomen CaE-1, CaE-2 and CaE-3 were assayed according to their respective specific substrate α -naphthyl acetate (α -NA), β -naphthyl acetate (β -NA) or p-nitrophenyl acetate (p-NPA), respectively. The reaction medium contained 0.01 mM acetylcholinesterase inhibitor BW284C51, 0.1 mM α -NA, β -NA or p-NPA and 100 mM sodium phosphate (NaH₂PO₄) pH 7.0. For CaE-1 and CaE-2, catalysis proceeded for 1 min and was stopped by adding 0.2 reaction volume of a solution containing 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 4 mg.mL⁻¹ fast garnet GBC sulfate salt. The absorbance was read at 568 nm and 515 nm, respectively. CaE 3 activity was continuously monitored at 410 nm (88).

Adenosine triphosphate (ATP)

ATP, the energy fuel of the cell, is also a coenzyme involved in numerous metabolic reactions. ATP content in the head, midgut and semen was determined using ATPlite kit (PerkinElmer) based on luminescence measurements produced by the oxidation of D-luciferin by luciferase that involves 1 molecule of ATP and O₂ (80, 89).

Reducing potential (Red Pot)

The Red Pot corresponds to the ability of cells to reduce compounds linked to metabolic activity. The Red Pot in semen was assessed using a Prestoblue kit (Invitrogen). The assay was based on the reduction of the cell permeable compound resazurin to a red fluorescent resorufin. The absorbance of resorufin was measured at 570 nm (80).

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GA3PDH)

GA3PDH reversibly catalyzes the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate (GA3P) in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) into 1,3-biphosphoglyceric acid (1,3-BPG) and the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) during glycolysis and plays an important role in energetic metabolism. GA3PDH can also catalyze the reverse reaction when gluconeogenesis overtakes glycolysis. GA3PDH activity was determined in the head with the reverse reaction using 3 phosphoglyceric acid (3-PGA), which is converted by phosphoglycerate kinase (PGK) into 1,3 BPG. 1,3-BPG is converted to GA3P in the presence of NADH whose oxidation was followed at 340 nm. The reaction medium contained 7 mM 3-PGA, 4 mM L-cysteine-HCL neutralized with sodium bicarbonate (NaHCO₃), 2 mM magnesium sulfate (MgSO₄), 120 μM NADH, 1.2 mM ATP, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5 units.mL⁻¹ 3-phosphoglycerate kinase (3-PGK), 80 mM triethanolamine buffer pH 7.0 (41).

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

G6PDH is a key enzyme of the pentose phosphate pathway that generates NADPH, which contributes to the regeneration of reduced glutathione (GSH) involved in the defenses against oxidative stress. This metabolic pathway also contributes to the biosynthesis of nucleotides, amino acids and some fatty acids involved in cell metabolism. G6PDH catalyzes the conversion of glucose-6-phosphate (G-6-P) in the presence of the oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) into 6-phosphogluconolactone and the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH). Head G6PDH activity was determined by continuously following the formation of NADPH at 340 nm. The reaction medium contained 100 mM Tris-HCl buffer at pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM G-6-P, 0.5 mM NADP⁺ and 100 mM Tris-HCl pH 7.4 (41).

Lactate dehydrogenase (LDH)

LDH catalyzes the conversion of pyruvate into lactate in the presence of NADH. In anaerobic conditions, LDH enables the regeneration of NAD⁺ used in the glycolysis pathway. The regeneration of NAD⁺ was followed at 340 nm to determine LDH activity in the head and seminal fluid. The reaction medium contained 5 mM EDTA, 0.2 mM NADH, 2 mM sodium pyruvate and 50 mM triethanolamine pH 7.6 (90).

Glutathione-S-transferase (GST)

GST is mainly involved in the reaction conjugating GSH to exogenous compounds such as xenobiotics or endogenous products from cell metabolism such as reactive oxygen species (ROS). Thus, GST plays a role in xenobiotic detoxification, antioxidant defense and metabolic regulation. GST activity in the head and midgut was determined by measuring the conjugation of GSH to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) at 340 nm. The reaction medium contained 1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 1 mM CDNB and 100 mM Na/K phosphate pH 7.4. (91).

Superoxide dismutase (SOD)

SOD converts the superoxide anion (O₂^{•-}) into hydrogen peroxide (H₂O₂) to limit oxidative stress. SOD activity was indirectly measured in seminal fluid using the xanthine/xanthine oxidase system to generate O₂^{•-} and nitro blue tetrazolium (NBT). SOD competes with xanthine oxidase and limits the generation of reduced NBT, which was followed at 560 nm. The reaction medium contained 0.1 mM EDTA, 0.1 mM xanthine, 0.025 mM NBT, 0.00833 U/mL xanthine oxidase, and 50 mM phosphate/carbonate pH 7.8 (80).

Glutathione peroxidase (GP)

The GP catalyzes the destruction of peroxides, such as H₂O₂, by oxidizing GSH and generating H₂O and oxidized glutathione (GSSG). Thus, GP contributes to the regulation of reactive oxygen species (ROS) involved in oxidative stress. Head GP was assayed using tert-butyl hydroperoxide (TBHP) as the substrate. The generated GSSG was reduced by glutathione reductase (GR) in the presence of NADPH to generate GSH and NADP. The conversion of NADPH in NADP⁺ was followed at 340 nm. The reaction medium contained 1 mM EDTA, 0.2 mM TBHP, 0.85 mM GSSG, 0.16 mM NADPH, 0.25 U/mL GR and 50 mM Na/K phosphate pH 7.4 (65).

Glutathione reductase (GR)

As described above, GR enables the regeneration of GSH involved in the regulation of oxidative stress. Head GR was followed at 340 nm by the conversion of NADPH into NADP⁺. The reaction medium contained 1 mM EDTA, 0.85 mM GSSG, 0.16 mM NADPH and 50 mM Na/K phosphate pH 7.4 (65).

Catalase (CAT)

The CAT catalyzes the decomposition of H₂O₂ into oxygen (O₂) and water (H₂O) to protect cells against oxidative stress. The decomposition of H₂O₂ by CAT was followed in head, midgut and spermatozoa at 240 nm. The reaction medium contained 30 mM H₂O₂ and 100 mM sodium phosphate pH 7.0 (92).

Statistical Analysis

Parameters for which one measure per hive were performed (i.e., drone survival rate, sexual maturity rate, semen volume per drone, spermatozoa concentration in semen and physiological markers in semen; n = 4 per modality of treatment) used a post-hoc Wilcoxon test because the small number of data points required a non-parametric test. Parameters for which several measures per hive were performed (i.e., physiological markers response in drones and the level of *N. ceranae* infestation; n = 12 per modality of treatment) used a generalized linear mixed model with random effect on the hive from which drones came. These statistical analyses were performed using the package "lme4" in R software (93).

The effects of different treatments on drone physiology were described with 2 complementary approaches. A principal component analysis (PCA) was performed using the package "ade4" in the R software (94). To compare groups from the PCA representation, a post-hoc Wilcoxon test was applied on the values of the two main axes of the PCA. In addition, a hierarchical classification of data was performed using PermutMatrix software for analyzing and visualizing data (95). For the latter approach, data normalization was required to convert each measure to the rate of variation compared to the average of controls. These analyses were performed considering physiological marker responses, first in drone and then in drones plus semen.

References and Notes

1. D. Pellati, I. Mylonakis, G. Bertoloni, C. Fiore, A. Andrisani, G. Ambrosini, D. Armanini, Genital tract infections and infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140, 3-11 (2008).
2. E. Moretti, M. G. Federico, V. Giannerini, G. Collodel, Sperm ultrastructure and meiotic segregation in a group of patients with chronic hepatitis B and C. *Andrologia* 40, 173-178 (2008).
3. N. C. Feki, N. Abid, A. Rebai, A. Sellami, B. Ben Ayed, M. Guermazi, A. Bahloul, T. Rebai, L. K. Ammar, Semen Quality Decline Among Men in Infertile Relationships: Experience Over 12 Years in the South of Tunisia. *J. Androl.* 30, 541-547 (2009).
4. W. Mnif, A. I. H. Hassine, A. Bouaziz, A. Bartegi, O. Thomas, B. Roig, Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 2265-2303 (2011).
5. L. Multigner, A. Oliva, Environment as a risk factor for male infertility. *Sci. World J.* 1, 576-578 (2001).
6. H. Levine, S. H. Swan, Is dietary pesticide exposure related to semen quality? Positive evidence from men attending a fertility clinic. *Hum. Reprod* 30, 1287-1289 (2015).
7. C. R. Tyler, S. Jobling, J. P. Sumpter, Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361 (1998).
8. T. H. Hutchinson, Reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicol. Lett.* 131, 75-81 (2002).
9. H. R. Kohler, R. Triebskorn, Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759-765 (2013).
10. L. S. Bauer, G. L. Nordin, Effect of nosema-fumiferanae (microsporida) on fecundity, fertility, and progeny performance of choristoneura-fumiferana (lepidoptera, tortricidae). *Environ. Entomol.* 18, 261-265 (1989).
11. E. DelCacho, J. I. Marti, A. Josa, J. Quilez, C. SanchezAcedo, Effect of Varroa jacobsoni parasitization in the glycoprotein expression on Apis mellifera spermatozoa. *Apidologie* 27, 87-92 (1996).
12. P. Duay, Relation between the level of preimaginal infestation by the broodmite Varroa destructor and adult life expectancy in drone honeybees (Hymenoptera : Apidae : Apis mellifera). *Entomol. Gen.* 26, 213-218 (2002).
13. R. K. Seth, J. J. Kaur, D. K. Rao, S. E. Reynolds, Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonists RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in Spodoptera litura. *J. Insect Physiol.* 50, 505-517 (2004).

14. L. Gauthier, M. Ravallec, M. Tournaire, F. Cousserans, M. Bergoin, B. Dainat, J. R. de Miranda, Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS One* 6, e16217 (2011).
15. L. J. Brennan, J. A. Haukedal, J. C. Earle, B. Keddie, H. L. Harris, Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of Wolbachia-infected *Drosophila simulans*. *Insect. Mol. Biol.* 21, 510-520 (2012).
16. A. M. Collins, J. S. Pettis, Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* 44, 351-356 (2013).
17. S. Misra, A. Singh, H. R. C, V. Sharma, M. K. Reddy Mudiam, K. R. Ram, Identification of *Drosophila*-based endpoints for the assessment and understanding of xenobiotic-mediated male reproductive adversities. *Toxicol. Sci.* 141, 278-291 (2014).
18. Y. Peng, B. Baer-Imhoof, A. H. Millar, B. Baer, Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Sci. Rep.* 5, 10565 (2015).
19. G. R. Williams, A. Troxler, G. Retschnig, K. Roth, O. Yañez, D. Shutler, P. Neumann, L. Gauthier, Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Sci. Rep.* 5, 14621 (2015).
20. G. Kairo, B. Provost, S. Tchamitchian, F. Ben Abdelkader, M. Bonnet, M. Cousin, J. Senechal, P. Benet, A. Kretzschmar, L. P. Belzunces, J. L. Brunet, Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci. Rep.* 6, 31904 (2016).
21. V. Chaimanee, J. D. Evans, Y. P. Chen, C. Jackson, J. S. Pettis, Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Physiol.* 89, 1-8 (2016).
22. M. L. McCallum, M. Matlock, J. Treas, B. Safi, W. Sanson, J. L. McCallum, Endocrine disruption of sexual selection by an estrogenic herbicide in the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Ecotoxicology* 22, 1461-1466 (2013).
23. A. L. Knight, L. Flexner, Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantranilipole, an anthranilic diamide insecticide. *Pest Manag. Sci.* 63, 180-189 (2007).
24. I. Laycock, K. M. Lenthall, A. T. Barratt, J. E. Cresswell, Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* 21, 1937-1945 (2012).
25. K. T. Tassou, R. Schulz, Low field-relevant tebufenozide concentrations affect reproduction in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in a long-term toxicity test. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 3735-3742 (2013).
26. C. Sandrock, L. G. Tanadini, J. S. Pettis, J. C. Biesmeijer, S. G. Potts, P. Neumann, Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agric. For. Entomol.* 16, 119-128 (2014).

27. M. A. Costa, V. F. Moscardini, P. D. Gontijo, G. A. Carvalho, R. L. de Oliveira, H. N. de Oliveira, Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology* 23, 1399-1408 (2014).
28. D. Xiao, T. Yang, N. Desneux, P. Han, X. Gao, Assessment of Sublethal and Transgenerational Effects of Pirimicarb on the Wheat Aphids *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *PLoS One* 10, e0128936 (2015).
29. R. Pigeault, J. Vezilier, A. Nicot, S. Gandon, A. Rivero, Transgenerational effect of infection in *Plasmodium*-infected mosquitoes. *Biol. Lett.* 11, 20141025 (2015).
30. B. Sures, Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol.* 20, 170-177 (2004).
31. C. Vidau, H. El Alaoui, D. G. Biron, F. Delbac, Mais où sont passées les abeilles ? *Biofutur* 327, 56-59 (2011).
32. M. Holmstrup, A. M. Bindsbol, G. J. Oostingh, A. Duschl, V. Scheil, H. R. Kohler, S. Loureiro, A. Soares, A. L. G. Ferreira, C. Kienle, A. Gerhardt, R. Laskowski, P. E. Kramarz, M. Bayley, C. Svendsen, D. J. Spurgeon, Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746-3762 (2010).
33. R. Relyea, J. Hoverman, Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol. Lett.* 9, 1157-1171 (2006).
34. C. Alaux, J. L. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, M. Cousin, J. Brillard, A. Baldy, L. P. Belzunces, Y. Le Conte, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774-782 (2010).
35. C. Vidau, M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Vignes, J. L. Brunet, C. Texier, D. G. Biron, N. Blot, H. El Alaoui, L. P. Belzunces, F. Delbac, Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550 (2011).
36. J. Aufauvre, D. G. Biron, C. Vidau, R. Fontbonne, M. Roudel, M. Diogon, B. Vignes, L. P. Belzunces, F. Delbac, N. Blot, Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 326 (2012).
37. G. Retschnig, P. Neumann, G. R. Williams, Thiacloprid–*Nosema ceranae* interactions in honey bees: host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *J. Invert. Pathol.* 118, 18-19 (2014).
38. J. Aufauvre, B. Misme-Aucouturier, B. Vignes, C. Texier, F. Delbac, N. Blot, Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* 9, e91686 (2014).
39. F. Sanchez-Bayo, D. Goulson, F. Pennacchio, F. Nazzi, K. Goka, N. Desneux, Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environ. Int.* 89-90, 7-11 (2016).

40. C. Dussaubat, A. Maisonnasse, D. Crauser, S. Tchamitchian, M. Bonnet, M. Cousin, A. Kretzschmar, J. L. Brunet, Y. Le Conte, Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Sci. Rep.* 6, 31430 (2016).
41. M. T. Renzi, M. Amichot, D. Pauron, S. Tchamitchian, J. L. Brunet, A. Kretzschmar, S. Maini, L. P. Belzunces, Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 127, 205-213 (2016).
42. S. G. Potts, J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger, W. E. Kunin, Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.* 25, 345-353 (2010).
43. D. Goulson, E. Nicholls, C. Botias, E. L. Rotheray, Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347, 1255957 (2015).
44. P. Neumann, N. Carreck, Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49, 1-6 (2010).
45. D. vanEngelsdorp, M. D. Meixner, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80-S95 (2010).
46. M. L. Winston, *The Biology of the Honeybee* (Harvard University Press, Cambridge, MA, 1987).
47. B. Baer, Sexual selection in Apis bees. *Apidologie* 36, 187-200 (2005).
48. D. R. Tarpy, Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 99-103 (2003).
49. H. R. Mattila, T. D. Seeley, Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness. *Science* 317, 362-364 (2007).
50. B. P. Oldroyd, J. H. Fewell, Large fitness benefits from polyandry in the honey bee, *Apis mellifera*. *Trends. Ecol. Evol.* 23, 59-60 (2008).
51. T. E. Rinderer, L. I. De Guzman, V. A. Lancaster, G. T. Delatte, J. A. Stelzer, Varroa in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan (R) on drone honey bees. *Am. Bee J.* 139, 134-139 (1999).
52. H. A. Sylvester, R. P. Watts, L. I. De Guzman, J. A. Stelzer, T. E. Rinderer, Varroa in the mating yard: II. The effects of Varroa and fluvalinate on drone mating competitiveness. *American Bee Journal* 139, 225-227 (1999).
53. A. M. Collins, J. S. Pettis, Effect of varroa infestation on semen quality. *Am. Bee J.* 141, 590-593 (2001).
54. L. M. Burley, R. D. Fell, R. G. Saacke, Survival of honey bee (Hymenoptera : Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J. Econ. Entomol.* 101, 1081-1087 (2008).

55. L. Straub, L. Villamar-Bouza, S. Bruckner, P. Chantawannakul, L. Gauthier, K. Khongphinitbunjong, G. Retschnig, A. Troxler, B. Vidondo, P. Neumann, G. R. Williams, Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 283, 20160506 (2016).
56. M. Higes, R. Martin-Hernandez, A. Meana, *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375-392 (2010).
57. A. Badiou-Beneteau, A. Benneveau, F. Geret, H. Delatte, N. Becker, J. L. Brunet, B. Reynaud, L. P. Belzunces, Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int.* 60, 31-41 (2013).
58. S. M. Carvalho, L. P. Belzunces, G. A. Carvalho, J. L. Brunet, A. Badiou-Beneteau, Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2117-2124 (2013).
59. J. Wegener, H. Ruhnke, K. Milchreit, K. Kleebaum, M. Franke, S. Mispagel, G. Bischoff, G. Kamp, K. Bienefeld, Secondary biomarkers of insecticide-induced stress of honey bee colonies and their relevance for overwintering strength. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 379-389 (2016).
60. G. Di Pasquale, M. Salignon, Y. Le Conte, L. P. Belzunces, A. Decourtye, A. Kretzschmar, S. Suchail, J. L. Brunet, C. Alaux, Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 8, e72016 (2013).
61. D. vanEngelsdorp, J. Hayes, R. M. Underwood, J. Pettis, A survey of Honey Bee colony losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS One* 3, e4071 (2008).
62. R. Brodschneider, R. Moosbeckhofer, K. Crailsheim, Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. Apic. Res.* 49, 23-30 (2010).
63. E. Genersch, W. von der Ohe, H. Kaatz, A. Schroeder, C. Otten, R. Buchler, S. Berg, W. Ritter, W. Muhlen, S. Gisder, M. Meixner, G. Liebig, P. Rosenkranz, The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352 (2010).
64. B. A. Williams, Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell. Microbiol.* 11, 1551-1560 (2009).
65. C. Dussaubat, J. L. Brunet, M. Higes, J. K. Colbourne, J. Lopez, J. H. Choi, R. Martin-Hernandez, C. Botias, M. Cousin, C. McDonnell, M. Bonnet, L. P. Belzunces, R. F. Moritz, Y. Le Conte, C. Alaux, Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e37017 (2012).
66. Q. Huang, P. Kryger, Y. Le Conte, R. F. Moritz, Survival and immune response of drones of a *Nosemosis* tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *J. Invert. Pathol.* 109, 297-302 (2012).

67. D. Nicodemo, M. A. Maioli, H. C. D. Medeiros, M. Guelfi, K. V. B. Balieira, D. De Jong, F. E. Mingatto, Fipronil and Imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2070-2075 (2014).
68. T. C. Roat, S. M. Carvalho, R. C. Nocelli, E. C. Silva-Zacarin, M. S. Palma, O. Malaspina, Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 456-466 (2013).
69. T. C. Roat, J. R. dos Santos-Pinto, L. D. Dos Santos, K. S. Santos, O. Malaspina, M. S. Palma, Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. *Ecotoxicology* 23, 1659-1670 (2014).
70. X. Wang, M. A. Martinez, Q. Wu, I. Ares, M. R. Martinez-Larranaga, A. Anadon, Z. Yuan, Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 2016 (10.1080/10408444.2016.1223014).
71. D. Gibbons, C. Morrissey, P. Mineau, A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 103-118 (2015).
72. N. Simon-Delso, V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, M. Chagnon, C. Downs, L. Furlan, D. W. Gibbons, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D. P. Kreuzweiser, C. H. Krupke, M. Liess, E. Long, M. McField, P. Mineau, E. A. Mitchell, C. A. Morrissey, D. A. Noome, L. Pisa, J. Settele, J. D. Stark, A. Tapparo, H. Van Dyck, J. Van Praagh, J. P. Van der Sluijs, P. R. Whitehorn, M. Wiemers, Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 5-34 (2015).
73. A. Decourtye, J. Devillers, E. Genecque, K. Le Menach, H. Budzinski, S. Cluzeau, M. H. Pham-Delegue, Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 242-250 (2005).
74. A. K. El Hassani, M. Dacher, M. Gauthier, C. Armengaud, Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 30-39 (2005).
75. Y. Aliouane, A. K. El Hassani, V. Gary, C. Armengaud, M. Lambin, M. Gauthier, Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113-122 (2009).
76. A. Bernadou, F. Demares, T. Couret-Fauvel, J. C. Sandoz, M. Gauthier, Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J. Insect Physiol.* 55, 1099-1106 (2009).
77. A. Decourtye, S. Lefort, J. Devillers, M. Gauthier, P. Aupinel, M. Tisseur, Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. *Julius-Kühn-Archiv.* 423, 75-83 (2010).

78. S. Camazine, I. Cakmak, K. Cramp, J. Finley, J. Fisher, M. Frazier, A. Rozo, How healthy are commercially-produced US honey bee queens? *Am. Bee J.* 138, 677-680 (1998).
79. J. Rhodes, D. Somerville, Introduction and Early Performance of Queen Bees: Some Factors Affecting Success : a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation (Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, 2003).
80. F. Ben Abdelkader, G. Kairo, S. Tchamitchian, M. Cousin, J. Senechal, D. Crauser, J. P. Vermandere, C. Alaux, Y. Le Conte, L. P. Belzunces, N. Barbouche, J. L. Brunet, Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45, 215-223 (2014).
81. A. Meana, R. Martín-Hernández, M. Higes, The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *J. Apic. Res.* 49, 212-214 (2010).
82. J. M. Bonmatin, C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D. P. Kreuzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro, E. A. D. Mitchell, D. A. Noome, N. Simon-Delso, A. Tapparo, Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int* 22, 35-67 (2015).
83. S. W. Cobey, Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38, 390-410 (2007).
84. L. P. Belzunces, J.-J. Lenoir-Rousseaux, M. Bounias, Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads. *Insect Biochem.* 18, 811-819 (1988).
85. G. F. Weirich, A. M. Collins, V. P. Williams, Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33, 3-14 (2002).
86. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95 (1961).
87. M. Bounias, I. Kruk, M. Nectoux, D. Popeskovic, Toxicology of cupric salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 67-76 (1996).
88. G. Gomori, Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.* 42, 445-453 (1953).
89. I. A. Cree, P. E. Andreotti, Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicol. In Vitro* 11, 553-556 (1997).
90. H. Al-Lawati, G. Kamp, K. Bienefeld, Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *J. Insect Physiol.* 55, 116-121 (2009).
91. W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139 (1974).

92. R. F. Beers, Jr., I. W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133-140 (1952).

93. D. Bates, M. Maechler, B. Bolker, S. Walker, Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1-48 (2015).

94. S. Dray, A.-B. Dufour, The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22, 1-20 (2007).

95. G. Caraux, S. Pinloche, PermutMatrix: a graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 21, 1280-1281 (2005).

Acknowledgements

General

Special thanks to the members of the research unit “Abeilles & Environnement” for their help with the infection of drones by *N. ceranae*, and Jacques Sénéchal for his competent beekeeping.

Funding

This study was supported in part by the European Community Program for French beekeeping coordinated by the French Ministry of Agriculture (FranceAgriMer agreement 11-42R), the Région Provence Alpes Côte d’Azur, the department “Santé des Plantes & Environnement” of the French National Institute for Agricultural Research (INRA), and the company “Apiculture Remuaux”.

Author contributions

G.K., L.P.B. and J.-L.B. designed the experiments. G.K., F.B.A., M.B., S.T., M.C., C.D, B.B. and J.-L.B. performed the experiments. G.K., A.K. and D.G.B. performed the data analyses and statistical analyses. G.K., D.G.B., L.P.B. and J.-L.B. wrote the paper. All of the authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Bilan

Cette étude a permis de mettre en évidence des modes d'action différents du Fipronil et de *N. ceranae* et des effets synergiques de la combinaison de ces deux stressseurs sur la physiologie des faux-bourçons allant jusqu'à engager leur survie. Cependant, les analyses de semences n'ont pas permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle des effets synergiques pouvaient se produire sur la fertilité. En revanche, il était inquiétant de constater que la qualité des semences était fortement altérée même dans le cas d'une exposition au parasite seul pour laquelle la physiologie générale des mâles ne semblait que très peu affectée. Ainsi, ces résultats suggèrent que la fonction de reproduction est extrêmement sensible aux conditions de stress. Un stressseur seul pourrait ne pas avoir d'effets sur la vitalité des individus mais affecter fortement leur fertilité. Ces résultats vont dans le sens d'un appauvrissement général de la fertilité des faux-bourçons qui sont exposés en permanence à de nombreux facteurs de stress, confortant de ce fait l'hypothèse d'une défaillance des reines due au stockage de semences altérées. De plus, la présence de perturbations physiologiques importantes et le fait que la survie des mâles soit engagée suggèrent que l'appauvrissement de la qualité des reines puisse être aussi la conséquence d'une pénurie de mâles en bonne santé dans les aires d'accouplement. Cette pénurie pourrait avoir comme effets préjudiciables (i) une baisse de la diversité génétique des semences stockées par la reine et (ii) un stockage de semences provenant de mâles moins vigoureux et moins adaptés à leur environnement qui auraient eu l'opportunité de transmettre leur patrimoine génétique à cause de la baisse de la pression de sélection.

Ainsi, même si de nombreux travaux sont encore nécessaires pour appréhender avec certitude tous les enjeux de l'exposition des faux-bourçons aux stressseurs environnementaux, leur rôle concernant le bon déroulement du cycle de vie de la colonie est incontestable. De ce fait, une meilleure évaluation des troubles de la fertilité de ces individus clés liés à une exposition aux facteurs de stress, et plus particulièrement aux polluants issus de l'activité humaine dont les substances agrochimiques, semble incontournable dans l'avenir.

Partie 4

Vers une évaluation des effets
toxiques des produits
phytopharmaceutiques sur les
faux-bourçons et leur fertilité ?

Avant-propos

Les deux études, présentées dans la partie précédente, ont permis de mettre en évidence des effets du pesticide Fipronil sur la fertilité des faux-bourçons et leurs conséquences sur le potentiel reproducteur des reines. Parallèlement, une étude suisse a montré qu'une exposition des mâles, pendant leur phase de développement, à une combinaison de deux insecticides néonicotinoïdes (Thiaméthoxam et Clothianidine) affectait aussi leurs capacités reproductrices en induisant une létalité à la fois chez les individus et les spermatozoïdes présents dans les vésicules séminales (Straub et al. 2016). L'ensemble de ces résultats a mis en avant les effets reprotoxiques des familles de pesticides néonicotinoïdes et phénylpyrazoles sur la reproduction de l'abeille domestique à travers une exposition des mâles et soulève le problème du manque de considération des effets reprotoxiques dans la procédure d'évaluation du risque liés à l'usage des substances phytopharmaceutiques.

Actuellement, la toxicité des substances sur la fonction de reproduction chez l'abeille n'est pas considérée dans la procédure d'évaluation du risque en vue de l'obtention des autorisations de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques. En effet, pour ne citer que le cas de l'Europe, la réglementation spécifique que des tests de toxicité d'une substance doivent être entrepris si une exposition des abeilles à cette substance est plausible (EC 1991, EC 2009). Ces tests doivent être en accord avec les procédures établies par des organisations intergouvernementales telles que l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) et l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). Ces tests portent principalement sur une évaluation des effets létaux, le plus souvent à 48 h, suite à une exposition aiguë par voie orale ou de contact (OECD 1998, OECD 1998, EPPO 2010). Si la substance est suspectée d'agir comme régulateur de croissance des insectes, un test de toxicité chronique sur larve peut également être effectué (OECD 2013). Suite aux tests précédents, si un risque est détecté, des tests en conditions semi-contrôlées, pour évaluer les effets à l'échelle de la colonie sur le taux de mortalité et la surface de couvain, peuvent être entrepris (OECD 2014). Ainsi les procédures actuelles sont loin de considérer l'ensemble des conséquences d'une exposition aux substances phytopharmaceutiques chez l'abeille, dont les effets sublétaux qui incluent une potentielle sensibilisation aux autres stressés environnementaux, les troubles des fonctions motrices, des fonctions cognitives ou encore de la reproduction.

Face à ce constat, deux approches, en conditions contrôlées de laboratoire et semi-contrôlées sous tunnels recouverts d'un filet anti-insectes, sont proposées dans le but d'évaluer les potentiels effets reprotoxiques des pesticides chez les mâles exposés de la naissance à la maturité sexuelle. La méthode d'élevage en conditions de laboratoire utilisée dérive de celle présentée dans la première étude qui nécessitait des améliorations. Cette méthode présentait des problèmes d'agressivité des abeilles accompagnatrices vis-à-vis des mâles aux alentours du 10^{ème} et 12^{ème} jour mettant en péril leur survie (cf. partie 2). Pour remédier à ce problème, la solution fut d'ajouter au 10^{ème} jour au sein de chacune des cages un groupe d'abeilles émergentes afin d'apporter à la colonie de nouvelles abeilles nourrices et d'entretenir un équilibre plus naturel de la colonie. Cette action eut pour effet concluant de supprimer ce comportement agressif. Des modifications furent aussi apportées dans le protocole d'alimentation. En effet, des travaux, que nous avons réalisés en parallèle, ont mis en évidence que l'apport d'une solution sucrée plus concentrée et complémentée avec une solution protéinée, améliorait considérablement la survie des individus maintenus en conditions de laboratoire. Ces travaux concernant l'alimentation des abeilles maintenues en conditions de laboratoire devraient faire l'objet d'une publication dans l'avenir.

Une exposition des mâles au Fipronil selon les deux approches a pu être ainsi réalisée et a permis d'évaluer la pertinence de celles-ci dans un contexte d'évaluation du risque pour la reproduction de l'abeille lié à l'utilisation des pesticides.

Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de révision :

«Assessment of the toxicity of pesticides to honey bee drone fertility using laboratory and semi-field approaches: case study with Fipronil»

Guillaume Kairo, Yannick Poquet, Haïthem Haji, Sylvie Tchamitchian, Marianne Cousin, Marc Bonnet, Michel Pelissier, André Kretzschmar, Luc P. Belzunces, Jean-Luc Brunet

Article en cours de révision à la revue *Environmental Toxicology & Chemistry*

Résumé

Les effets toxiques des substances phytopharmaceutiques, pour la reproduction de l'abeille domestique, font l'objet d'une inquiétude grandissante. Cependant, ces effets ne sont pas considérés dans les procédures d'évaluation du risque conduites dans le cadre de l'enregistrement des substances phytopharmaceutiques. De ce fait, il est urgent de fournir des méthodes pour évaluer les effets potentiels de ces substances sur la reproduction de l'abeille. Dans ce but, deux approches différentes, en conditions semi-contrôlées et contrôlées, ont été utilisées pour évaluer les effets du Fipronil sur la fertilité des faux-bourçons. Pour chacune des approches, les mâles ont été élevés de l'émergence à la maturité sexuelle, pendant 20 jours, et exposés à l'insecticide Fipronil par le biais d'une solution sucrée contaminée. Dans chacune des conditions, les effets du Fipronil ont été déterminés par l'étude de traits d'histoire de vie et des indicateurs de fertilité. Les résultats ont montré que la survie, le taux de maturité sexuelle et la quantité de semences produites étaient meilleurs en conditions contrôlées de laboratoire. Ces différences peuvent être en partie expliquées par les conditions environnementales, dont les facteurs climatiques, qui peuvent varier en conditions semi-contrôlées. Malgré ces points de différence, le Fipronil n'a induit aucun effet sur la survie, le taux de maturité et le volume de semence alors qu'une baisse du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes étaient observés chez les individus exposés pour chacune des conditions d'élevage. Ainsi, cette étude non seulement confirme les effets reprotoxiques du Fipronil mais souligne également la pertinence des deux approches utilisées pour évaluer les effets des substances phytopharmaceutiques.

Article 4 : Assessment of the toxicity of pesticides to honey bee drone fertility using laboratory and semi-field approaches: case study with Fipronil

Assessment of the toxicity of pesticides to honey bee drone fertility using laboratory and semi-field approaches: case study with Fipronil

Short title: Assessment of pesticide reprotoxicity to the honey bee

Authors:

Guillaume KAIRO[†], Yannick POQUET[†], Haïthem HAJI[†], Sylvie TCHAMITCHIAN[†], Marianne COUSIN[†], Marc BONNET[†], Michel PELISSIER[†], André KRETZSCHMAR[‡], Luc P. BELZUNCES[†], Jean-Luc BRUNET^{†*}

Affiliations:

[†] INRA, UR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, CS 40509, 84914 Avignon Cedex 9, France

[‡] INRA, UR 546 Biostatistiques & Processus Spatiaux, CS 40509, 84914 Avignon Cedex 9, France

*Correspondance to: jean-luc.brunet@inra.fr

Abstract

The concern about the reproductive toxicity of pesticides on honey bee reproducers is increasing. In a context where the reproduction of honey bee is not considered in the risk assessment procedure of pesticides registration, it appears important to be able to assess its potential impairments. To achieve this purpose, we used two different approaches in semi-field (SF) and laboratory (Lab) conditions to study the impact of Fipronil on drone fertility. For each approach, drones were reared from emergence to sexual maturity, for 20 days, and exposed via contaminated sugar syrup. The effects of Fipronil were determined in both cases by studying life traits and fertility indicators. Results showed that the survival and the maturity rate of drones were better in Lab than SF conditions. Moreover, drones reared in Lab had more seminal fluid. These differences could be explained by environmental factors that may vary in SF condition. However, whatever the approach used, Fipronil did not affect the survival rate, the maturity rate and the semen volume whereas it affected fertility, with a decrease of spermatozoa quantity associated to an increase of spermatozoa mortality rate. Consequently, these results confirm the effects of Fipronil on drone fertility and highlight the relevance of each approach to assess the potential reproductive toxicity of pesticides on honey bee.

Keywords: Plant protection products, honey bee, drone, reproductive toxicity, risk assessment

Introduction

In the last century, the worldwide increasing use of pesticides in agriculture has led to emerging concern on impacts on human and environment health. To address this concern, the developed nations have implemented strategies to assess the risk posed by pesticides and have regulated their use. In order to enhance the protection of human, animal and environment health, new substances are subject to a risk assessment procedure based on biological assays and/or consideration of available scientific data. In this procedure, biological assays must be in accordance with guidelines elaborated by intergovernmental organizations such as Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) and European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) bringing together respectively 35 and 50 member countries. In Europe, the placing of pesticides on the market, including active substances, softeners and synergists, is regulated and harmonized by the Regulation EC 1107/2009 [1], which replaced Council Directive 91/414/EEC [2]. Among others, to comply with the regulation, a new substance should not be classified, with regard to human, if it is carcinogenic, mutagenic, endocrine disruptor and/or toxic for reproduction under realistic proposed conditions of use [1]. Regarding the reproduction, regulatory authorities consider that adverse reproductive effects can result from an impairment of fertility in male and female and abnormal development of the offspring [2].

The pesticide registration dossier presents gaps in terms of assessment of sublethal effects on reproductive functions on non-target species. For mammals, adverse effects of active substances are assessed by toxicological tests focused on prenatal toxicity [3] and a two-generation study [4, 5] in model species such as rat. In these tests, sperm and oestrus cycle parameters are investigated as fertility indicators. Following the results of the exposure, extrapolation to human is made although toxicokinetics and reaction to toxicants may differ between the two species [6]. For ecotoxicological studies on non-target organisms, tests focused on reproduction may be required when a risk is suspected. However, the tests registered are less complete than those performed on mammals. They are mainly focused on offspring production from exposed parents and concern only few species, such as fishes [2, 7, 8], birds [2, 9], crustaceans [2, 10] and earthworms [2, 11] but not threatened pollinating insects, which are of great ecological and economical interest [12, 13].

The assessment of the risk associated with the use of pesticides for pollinating insect is even more superficial. Concerning the honey bee, the regulation merely specifies that the use of pesticides in the proposed conditions of use “will result in a negligible exposure of honeybees, or has no unacceptable acute or chronic effects on colony survival and development, taking into account effects on honeybee larvae and honeybee behaviour” [1]. When an exposure can occur, the regulatory authorities recommend performing laboratory tests to assess the oral and contact acute toxicity on adults [14-16]. If a product is likely to have systemic or insect growth regulating properties, a larval toxicity test must be performed [17]. Following these tests, if toxicity is demonstrated, a semi-field test is performed to assess effects at the colonial scale [14, 18]. In all cases, sublethal effects on learning, orientation, locomotion or physiological functions such as reproduction are not considered. Because reproductive functions are of major importance for colony growth and sustainability, scientists advise to take them into consideration [19, 20]. However, no standardized methods are available to assess the effects of pesticides on reproduction whereas the proofs of fertility impairment in reproducers and its involvement in honey bee decline are increasing [20-26].

In this context, it appears important to develop tools to assess the reproductive toxicity of pesticides on queens and drones, which are key individuals in the colonies. In this perspective, two approaches were developed to assess the effects of pesticides on drone fertility. The first concerns an approach in semi-field (SF) conditions, which differs from the open field by food control and isolation from exposure to other environmental pollutants [27]. The second concerns an improved method in laboratory (Lab) conditions from Ben Abdelkader et al (2014) [27]. Fipronil was chosen, as a relevant active substance, because it was already known to have adverse reproductive effects on drones [26]. Thus, the effects of Fipronil on drone were determined by studying drone survival, maturity, semen volume and fertility parameters such as the number and mortality rate of spermatozoa in semen. Results enabled comparing the relevance of each approach.

Materials and methods

To assess the effects of Fipronil on reproduction, we have used two complementary approaches. To avoid seasonal influence, the experiments in SF and Lab conditions were simultaneously performed in Avignon in June-July 2014. The biological material was obtained from experimental honey bee colonies (*Apis mellifera L.*) monitored for their sanitary status and treated with Amitraz in September 2013 to control varroa mite population. Drones and workers used for experiments were collected from 15 healthy colonies and were homogenized before being introduced in hives and in large cages [27] (Fig. 1A and 1B). In the two approaches, workers were used to take care of drones from emergence to sexual maturity (20 days old) (Fig. 1C). In both cases, individuals were fed with sugar syrup, crushed pollen and water [27]. For each rearing condition, exposed individuals were chronically fed with sugar syrup contaminated with Fipronil at the low environmental concentration of 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [28]. Food was changed every day and the amount gathered was noted. Twenty days after the introduction, surviving drones were caught to collect semen after a manual eversion of the endophallus (Fig. 1D). Drones that provided semen were considered to have reached sexual maturity. The collected semen was analyzed to assess the impact of Fipronil on drone fertility (Fig. 1).

Chemicals

Fipronil was purchased from TechLab and dimethyl sulfoxide (DMSO) from Sigma-Aldrich. The propidium iodide dye was contained in the LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit purchased from Molecular Probes L-7011. The protein and vitamin solution Bee Food® was obtained from Apiculture Remuau Company.

Rearing method in semi-field conditions

In SF conditions, drones were reared in queenless colonies introduced in compartmented tunnels covered with an insect-proof net (Fig. 1A). Colonies were composed of 5000 workers, 1 brood comb, and 5 combs without food. In each colony, 300 drones were cloistered using a queen excluder as described in previous studies [27]. In this study, 8 control colonies (Ctrl SF) and 8 colonies exposed to Fipronil (Fip SF) were used. For 20 days, colonies were supplied by foragers that collected the food provided daily in feeders outside the colony. This food corresponds to a sugar syrup (50% (w/v), 0.1 % (v/v) DMSO) contaminated or not with Fipronil at 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$. It was provided from 8:30 a.m. to 11:30 a.m. and replaced with crushed pollen and water for the remaining time [26].

Rearing method in laboratory conditions

In laboratory conditions, drones were reared in large cages placed in the dark in a thermostat-controlled chamber at $33 \pm 1^\circ\text{C}$ and $60 \pm 10\%$ RH. According to the method described by Ben Abdelkader et al, large cages were composed of 1000 newborn workers, 150 drones, 3 wax combs fixed on the top of the cage, a Beeboost® stick (Pherotech) that releases a queen mandibular pheromone, and a movable floor [27] (Fig. 1B). A filter paper was placed on the floor and replaced every 2 days to maintain good hygienic conditions. At the beginning of this study, the emergence of bees on a 24-hour period enabled to fill 6 cages for control drones (Ctrl Lab) and 5 cages for Fipronil-exposed drones (Fip Lab). For 20 days, bees were continuously fed with a sugar syrup [70% (w/v), 1% (v/v) of the solution of proteins and vitamins, 0.1% (v/v) DMSO] containing or not Fipronil at $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and crushed pollen and water ad libitum. The syrup given to the bees maintained in Lab conditions was more concentrated than the syrup given in SF conditions and was supplemented with proteins. This enables having a better survival rate and cleanliness in cage because bees cannot get out for their hygienic flights. Some points were improved in the method described previously. Ten days after the beginning of the experiment, 500 newborn nurses were added in each cage to take care of drones. From the 12th day until the end, the floor, previously positioned under the fixed waxes, was lowered by 3 cm every two days to progressively increase the space available to drones for flying. The mortality of the workers and drones was checked every 2 days throughout the experimentation period.

Semen collection and analyses

At the end of the experiments, for each cage or hive, the surviving 20 day-old drones were caught and the semen was collected. The semen of drones from the same hive or cage was pooled in the same glass capillary. For each cage or hive, the survival rate, the maturity rate (drones which provide sperm after stimulation) and the overall semen volume were determined. From the last two end points, the average semen volume per drone of each group was calculated. For these life traits, one measure per hive/cage was performed (i.e. $n = 8$ for Ctrl SF and Fip SF modalities, $n = 6$ for Ctrl Lab and $n = 5$ for Fip Lab). Then, the fertility was assessed with analyses of semen properties. The spermatozoa concentration was studied using a counting cell (Neubauer improved/Petroff®) [26] (Fig. 1E) and the number of spermatozoa per drone was calculated from the concentration and the average volume of semen of drones from each hive/cage. The spermatozoa

mortality rate was studied by staining with propidium iodide (Fig. 1F) and using a fluorimeter TECAN Infinite® F500 plate reader. The assay was performed with 100 μ L of diluted semen in Kiev solution containing 10^7 spermatozoa and 60 μ M propidium iodide. The fluorescence of dead spermatozoa (FI λ_{ex} =535 nm, λ_{em} =617 nm) was measured after incubation in the dark for 10 min at 34°C [26]. For these parameters, several samples were measured for each cage or hive (i.e. n = 24 for modalities Ctrl SF and Fip SF, n = 36 for Ctrl Lab and n = 30 for Fip Lab).

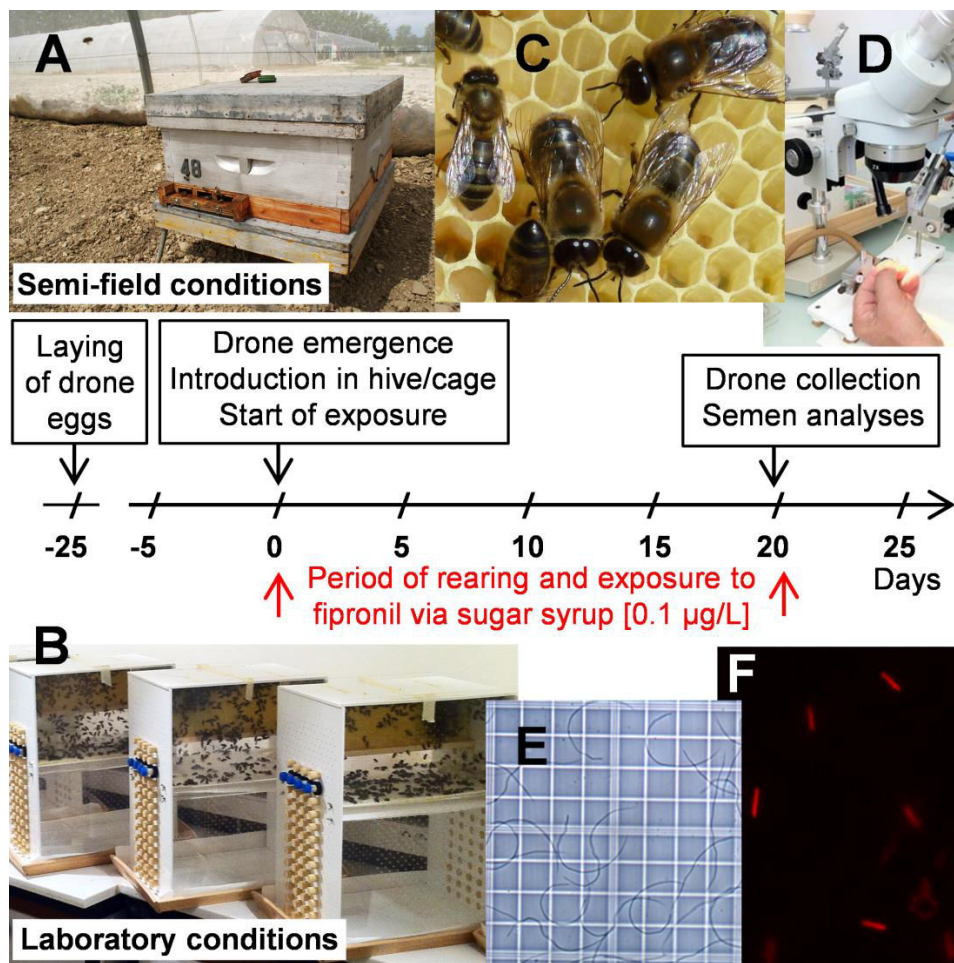


Figure 1. Experimental design of the study

To control the age of the drones, queens were caged on a frame 25 days before the start of the experiment. Drones were reared from emergence to sexual maturity in hives under semi-field conditions (A) or in cages under controlled laboratory conditions (B). For each rearing protocol, hives/cages were either daily exposed or not through the sugar syrup with a low environmental concentration of Fipronil [0.1 μ g/L]. At the end of the experiments, 20 day-old drones were caught (C) to collect semen. Drone life traits corresponding to drone survival, sexual maturity rate and semen volume were determined during the semen collection (D). Then the semen quality was investigated through fertility indicators such as the spermatozoa quantity using a counting chamber (E) and the spermatozoa mortality rate using propidium iodide staining (F).

Statistical analyses

For drone life traits (survival, maturity and semen volume), two-step statistical analyses were performed: i) A linear model plus anova to determine potential effects of rearing methods and/or treatments on different parameters, followed by ii) a post-hoc Wilcoxon test because the small number of data requested non parametric test for confirmation. For semen parameters, statistical analyses were performed using a generalized linear mixed model with a random effect on hive/cage from which drones came. These statistical analyses were performed using the package "lme4" in R software [29].

Results

Food collection and consumption

The amount of food collected in the feeders was daily measured to assess the effect of Fipronil on the worker feeding behaviour. For each rearing method, Fipronil did not affect the amount of syrup and pollen gathered by the bees (data not shown) as previously observed in SF conditions [26]. A comparison of the amount of food gathered by workers between rearing methods was not relevant because the feeding methods were different. Bees in Lab did not need to flight to gather food because they were directly supplied in the cage unlike those in SF. Whatsoever in cage or in hive, an assessment of the food ingested by individuals was not possible because most of the food gathered was stored in the comb cells.

Drone life traits

The survival, maturity and semen volume of 20 day-old drones were compared between the rearing and exposure conditions. Regarding these parameters, for all rearing methods used, Fipronil did not present any significant effects (Table 1). However, differences were observed between the rearing methods. Drones presented a higher survival rate in Lab (means of 73.7% in Ctrl Lab and 79.7% in Fip Lab) than in SF conditions (means of 50.9 % in Ctrl SF and 44.1 % in Fip SF). Similarly, they showed a higher maturity rate in Lab (means of 73.2% in Ctrl Lab and 72.2% in Fip Lab) than in SF conditions (means of 59.2 % in Ctrl SF and 61.8% in Fip SF). Whatever the modality of treatment, the mortality and maturity rates were statistically different between the two approaches at $P \leq 0.05$ (Table 1). Moreover, drones exhibited a slightly higher semen volume in Lab conditions

(up to 1 $\mu\text{L}/\text{drone}$). It was interesting to note that a lesser mortality rate, a higher maturity rate and a higher semen volume explained the similar volume of semen collected per group (c.a. 70 μl) although there were half drones in cages than in hives (Table 1).

	Semi-Field Conditions		Laboratory Conditions	
	Ctrl SF (n = 8)	Fip SF (n = 8)	Ctrl Lab (n = 6)	Fip Lab (n = 5)
	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD	mean \pm SD
Drone survival rate (%)	50.9 \pm 20.1 a	44.1 \pm 15.4 a	73.7 \pm 13.9 b	79.7 \pm 06.5 b
Drone maturity rate (%)	59.2 \pm 8.6 a	61.8 \pm 9.0 a	73.2 \pm 7.2 b	72.2 \pm 6.1 b
Semen volume per hive/cage (μL)	69.5 \pm 26.7 a	69.7 \pm 31.0 a	71.5 \pm 9.6 a	72.3 \pm 10.8 a
Semen volume per drone (μL)	0.91 \pm 0.07 a	0.93 \pm 0.07 a	1.00 \pm 0.07 a	0.94 \pm 0.09 a

Table 1. Effects of the exposure to Fipronil on drone life traits

Twenty day-old cloistered drones exposed or not to fipronil were captured to collect semen. Drone survival rate (%), sexual maturity rate (%) and the semen volume (μL) were measured for each hive/cage. Semen volume per drone (μL) is calculated from the overall semen volume and the number of drones collected. The data represent mean values \pm standard deviations obtained from drone populations recovered in hives/cages. “n” indicates the number of repetitions for each modality. Statistical analyses were performed using a post-hoc Wilcoxon test. For each parameter, significant differences at $P \leq 0.05$ between modalities are expressed with non-corresponding bold letters.

Semen quality

Spermatozoa quantity and mortality were used as indicators of drone fertility. Whatever the rearing method used, Fipronil altered drone fertility in a same way. The altered quantity of spermatozoa resulted from a decrease of spermatozoa (spz) concentration in semen (medians of 8.3×10^6 spz/ μL for Fip SF against 9.8×10^6 spz/ μL for Ctrl SF, $P \leq 0.01$, and 7.3×10^6 spz/ μL for Fip Lab against 8.2×10^6 spz/ μL for Ctrl Lab, $P \leq 0.05$, Fig. 2A) and a decrease of the number of spermatozoa per drone (medians of 8.0×10^6 spz for Fip SF against 8.8×10^6 spz for Ctrl SF, $P \leq 0.05$, and 6.7×10^6 spz for Fip Lab against 8.4×10^6 spz for Ctrl Lab, $P \leq 0.05$, Fig. 2B). Additionally, the insecticide induced an increase of the spermatozoa mortality rate (medians of 41.0% for Fip SF against 32.4% for Ctrl SF, $P \leq 0.01$, and 32.2% for Fip Lab against 28.0% for Ctrl Lab, $P \leq 0.05$, Fig. 3).

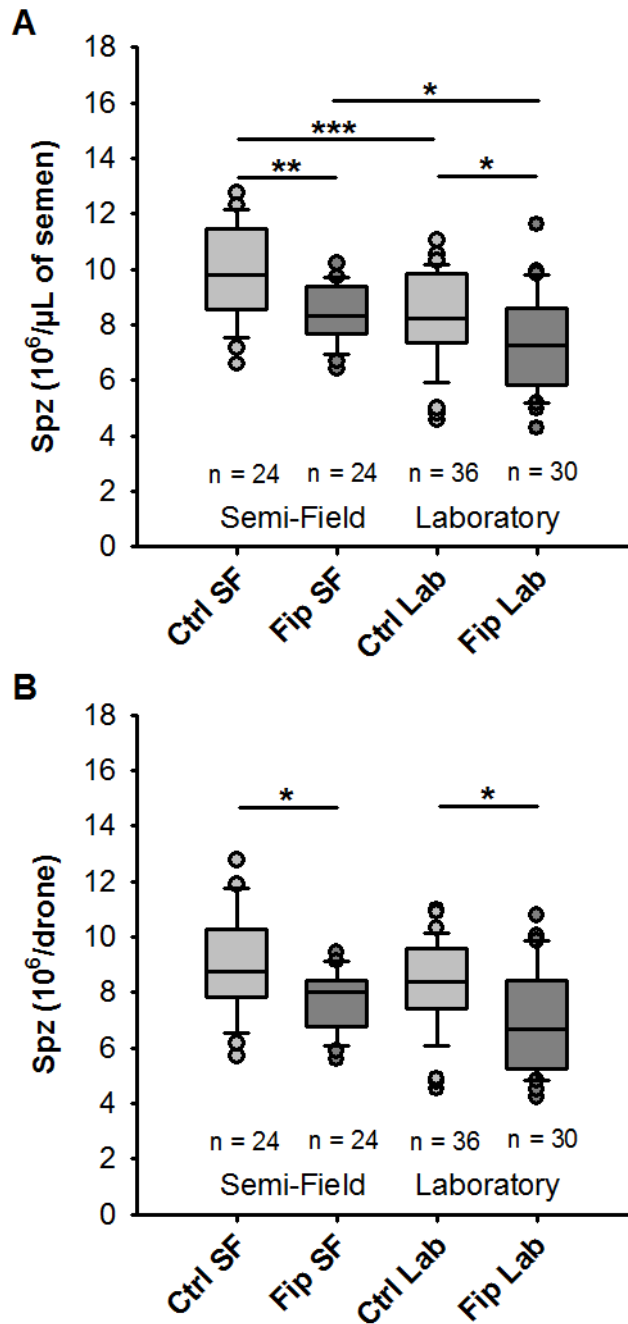


Figure 2. Effects of the exposure to Fipronil on the quantity of spermatozoa

To assess spermatozoa (spz) quantity, semen was diluted and observed under a phase contrast microscope. **(A)** Spermatozoa concentration in semen was expressed per microliter of semen. **(B)** Spermatozoa per drone was calculated from the spermatozoa concentration and the semen volume per drone. Statistical analyses were performed using a linear mixed model with random effect on hive/cage. “n” indicates the number of repetitions for each rearing and/or treatment condition. Asterisks indicate significant differences: * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$) and *** ($P \leq 0.001$).

Despite the similar responses of the drones to the stressor, the two rearing conditions presented differences in these fertility parameters, in addition to differences observed on drone mortality and maturity. Thus, drones reared in SF conditions presented a higher spermatozoa concentration than drones from Lab conditions (medians of 9.8×10^6 spz/ μ L for Ctrl SF against 8.2×10^6 spz/ μ L for Ctrl Lab, $P \leq 0.001$, and 8.3×10^6 spz/ μ L for Fip SF and 7.3×10^6 spz/ μ L for Fip Lab, $P \leq 0.005$, Fig. 2A). Nevertheless, the number of spermatozoa per drone was not statistically different between the rearing methods (medians of 8.8×10^6 spz/ μ L for Ctrl SF against 8.4×10^6 spz/ μ L for Ctrl Lab and 8.0×10^6 spz/ μ L for Fip SF against 6.7×10^6 spz/ μ L for Fip Lab, Fig. 2B). At last, no statistical differences in spermatozoa mortality rates were observed between rearing methods (medians of 32.4% for Ctrl SF against 28.0% for Ctrl Lab and 41.0% for Fip SF against 32.2% for Fip Lab (Fig. 3).

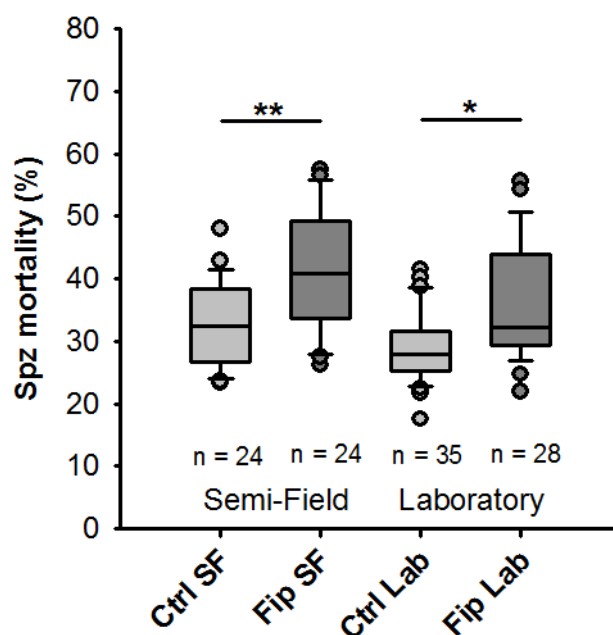


Figure 3. Effects of the exposure to Fipronil on the mortality rate of spermatozoa

The spermatozoa (spz) mortality rate was assessed by staining with propidium iodide followed by a reading of fluorescence intensity using a fluorimeter. The mortality rate of spermatozoa was expressed in percentage (%) of total spermatozoa population. Statistical analyses were performed using a linear mixed model with random effect on hive/cage. “n” indicates the number of repetitions for each modality. Asterisks indicate significant differences: * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$) and *** ($P \leq 0.001$).

Discussion

Adverse sublethal effects of pesticides on non-target invertebrate species, whose honey bee, are of major concern [30, 31] but are difficult to assess. In this context, we have developed usable tools to take into consideration a part of the potential hazard posed by pesticides to honey bee reproduction: a Lab approach, which is entirely controlled, and a SF approach, which is closer to natural conditions. The two approaches presented specific features that should be emphasized. It is interesting to note that the Lab method has some advantages such as the daily monitoring of the behaviour and the mortality (data not shown), and requires much less bees than the SF method for a similar volume of semen collected (Table 1). The SF approach has the advantage to mimick a foraging activity and behaviour of a colony subjected to climatic influences. Indeed weather conditions such as precipitations and extreme temperature conditions are additional stress factor could lead to colony weakening [32]. Knowing that environmental factors and food are of great influence on drone maintenance [33, 34] and fertility [35-37], it was not surprising that two different approaches induced slight differences in the results, as observed in part in a previous study [27]. These differences resulted in better survival and maturity rates with the Lab method (Table 1). Moreover, drones reared in Lab presented also a lower spermatozoa concentration in semen than those reared in SF (Fig. 2A). However, when considering the number of spermatozoa per drone, no difference was observed (Fig. 2B). This finding highlights that drones reared in Lab presented a higher volume of seminal fluid, an essential component of sperm. Among its essential functions for the spermatozoa conservation, the seminal fluid is required for providing nutrients to spermatozoa [38, 39], for the cell metabolism [40], for the protection against oxidative stress [40, 41] and for the protection against microbial threats [40]. Considering the previous information, depending on the approach used, an exposure to environmental stressors such as biological or chemical agents might result in different effects on drone life traits and fertility. To clarify this point, at least for chemical agents, drones reared in different ways were exposed or not to a relevant concentration of the insecticide Fipronil whose effects on drone fertility in SF conditions and consequences on queen reproductive potential were previously highlighted [26].

Although two different approaches were used, the exposure to Fipronil showed similar response on drone life traits and fertility. No effect was observed on mortality, maturity and semen volume between controls and exposed drones (Table 1). Regarding the fertility parameters, exposed drones presented a similar impairment of semen quality resulting in a decrease in the amount of spermatozoa (Fig. 2A and 2B) and an increase of spermatozoa mortality rate (Fig. 3). Thus, despite discrepancies in the environmental conditions, the observation of same effects of Fipronil on drone fertility highlighted the relevance of each approach and rendered the effects observed more relevant and much less questionable. Thus, the results obtained in Lab conditions may be considered here predictive of the results obtained in SF conditions, even field conditions. It is frequently argued that toxicological effects observed in laboratory conditions may not be predictive of the effects observed in field conditions because exposure can be overestimated and/or because of compensating factors that can occur in field [42-45]. However, if compensating factors could occur, it should be more legitimate considering aggravating factors such as wind, low temperature, hard worker labor, long distances for an efficient foraging, competition with other pollinators, scarce food resources, habitat fragmentation, monoculture farming and exposure to pathogens and other environmental pollutants. Thus, field or semi-field studies than have led to the banning or to restriction of the use or to moratorium on the use of substances, or families of substances, merely confirmed what was initially observed in laboratory conditions. It was the cases for organochlorine, cyclodiene, carbamate and organophosphorus insecticides in the past or, more recently, for neonicotinoids and fipronil [46-50]. In the future, in the best case, it would be good to determine all hazards associated with pesticide use on honey bee before their registration and not a posteriori. However, such approach does not appear realistic taking into account the large number of potential hazards. Anyway, the assessment of reproductive toxicity could appear as a minimum requirement.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Institute for Agricultural Research (INRA), Region PACA and Apiculture Remuoux Company. The authors thank Jacques Sénéchal, Wilson Oberstar, Jordan Gauthier and Clément Baudrier for their technical help.

References

- [1] EC. 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Vol L 309. Off. J. Eur. Union, Brussels.
- [2] EC. 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC). Vol L 230. Off. J. Eur. Com., Brussels.
- [3] OECD. 2001. Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. OECD Publishing, Paris, pp 1-11.
- [4] OECD. 2001. Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. OECD Publishing, Paris, pp 1-13.
- [5] OECD. 2011. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. OECD Publishing, Paris, pp 1-25.
- [6] Ulbrich B. 2013. Reproductive Toxicity Risk Assessment for Pesticides. In Barrow CP, ed, Teratogenicity Testing: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp 545-574.
- [7] OECD. 2009. Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, pp 1-40.
- [8] OECD. 2015. Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, pp 1-39.
- [9] OECD. 1984. Test No. 206: Avian Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, pp 1-12.
- [10] OECD. 2012. Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Paris, pp 1-25.
- [11] OECD. 2004. Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, pp 1-18.
- [12] Gallai N, Salles JM, Settele J, Vaissiere BE. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68:810-821.

- [13] Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25:345-353.
- [14] EPPO. 2010. PP 1/170 (4): Side-effects on honeybees. *EPPO Bulletin* 40:313-319.
- [15] OECD. 1998. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*. OECD Publishing, Paris, pp 1-8.
- [16] OECD. 1998. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*. OECD Publishing, Paris, pp 1-7.
- [17] OECD. 2013. Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*. OECD Publishing, Paris, pp 1-10.
- [18] OECD. 2014. Test No. 75: Guidance Document on the Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Brood test Under Semi-field Conditions. *OECD Series on Testing and Assessment*. OECD Publishing, Paris.
- [19] EFSA. 2012. Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). 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* 10:275 pp.
- [20] Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat MP, Classen C, Colin ME, Dupont T, Girolami V, Johnson R, Le Conte Y, Luckmann J, Marzaro M, Pistorius J, Porrini C, Schur A, Sgolastra F, Delso NS, van der Steen JJM, Wallner K, Alaux C, Biron DG, Blot N, Bogo G, Brunet JL, Delbac F, Diogon M, El Alaoui H, Provost B, Tosi S, Vidau C. 2013. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52:1-60.
- [21] Burley LM, Fell RD, Saacke RG. 2008. Survival of honey bee (Hymenoptera : Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J Econ Entomol* 101:1081-1087.
- [22] Collins AM, Pettis JS. 2013. Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* 44:351-356.
- [23] Chaimanee V, Evans JD, Chen Y, Jackson C, Pettis JS. 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J Insect Physiol* 89:1-8.
- [24] Williams GR, Troxler A, Retschnig G, Roth K, Yañez O, Shutler D, Neumann P, Gauthier L. 2015. Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Sci Rep* 5:14621.
- [25] Straub L, Villamar-Bouza L, Bruckner S, Chantawannakul P, Gauthier L, Khongphinitbunjong K, Retschnig G, Troxler A, Vidondo B, Neumann P, Williams GR.

2016. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *P Roy Soc Lon B-Bio* 283.

[26] Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Cousin M, Sénéchal J, Benet P, Kretzschmar A, Belzunces LP, Brunet J-L. 2016. Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci Rep* IN PRESS.

[27] Ben Abdelkader F, Kairo G, Tchamitchian S, Cousin M, Senechal J, Crauser D, Vermandere JP, Alaux C, Le Conte Y, Belzunces LP, Barbouche N, Brunet JL. 2014. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45:215-223.

[28] Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:35-67.

[29] Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67:1-48.

[30] Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81-106.

[31] Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, McField M, Morrissey CA, Noome DA, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Van der Sluijs JP, Van Dyck H, Wiemers M. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:68-102.

[32] vanEngelsdorp D, Meixner MD. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 103:S80-S95.

[33] Free JB, Williams IH. 1975. Factors determining rearing and rejection of drones by honeybee colony. *Anim Behav* 23:650-675.

[34] Boes KE. 2010. Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. *Insect Soc* 57:1-9.

[35] Sturup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav Ecol* 24:1192-1198.

[36] Bienkowska M, Panasiuk B, Wegrzynowicz P, Gerula D. 2011. The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *J Apic Sci* 55:161-168.

[37] Rousseau A, Giovenazzo P. 2016. Optimizing Drone Fertility With Spring Nutritional Supplements to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *J Econ Entomol* 109:1009-1014.

- [38] Blum MS, Glowska Z, Taber S. 1962. Chemistry of the Drone Honey Bee Reproductive System. II. Carbohydrates in the Reproductive Organs and Semen. *Ann Entomol Soc Am* 55:135-139.
- [39] Verma LR, Shuel RW. 1973. Respiratory metabolism of semen of honeybee, *apis-mellifera*. *J Insect Physiol* 19:97-103.
- [40] Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, Eubel H, Millar AH. 2009. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics* 9:2085-2097.
- [41] Weirich GF, Collins AM, Williams VP. 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33:3-14.
- [42] Schmuck R, Stadler T, Schmidt HW. 2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Manag Sci* 59:279-286.
- [43] Pilling E, Campbell P, Coulson M, Ruddle N, Tornier I. 2013. A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. *Plos One* 8.
- [44] Carreck NL, Ratnieksi FLW. 2014. The dose makes the poison: have "field realistic" rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies? *J Apic Res* 53:607-614.
- [45] Thompson H, Coulson M, Ruddle N, Wilkins S, Harkin S. 2016. Thiamethoxam: Assessing flight activity of honeybees foraging on treated oilseed rape using radio frequency identification technology. *Environ Toxicol Chem* 35:385-393.
- [46] EFSA. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA Journal* 11:1-51.
- [47] EFSA. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal* 11:1-58.
- [48] EFSA. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal* 11:1-55.
- [49] EFSA. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal* 11:1-68.
- [50] van der Sluijs JP, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, van Lexmond M, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs CA, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell EAD, Morrissey CA, Noome DA, Pisa L, Settele J, Simon-Delso N, Stark JD, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Whitehorn PR, Wiemers M. 2015. Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environ Sci Pollut Res* 22:148-154.

Bilan

Deux approches pour évaluer les effets reprotoxiques des pesticides chez les faux-bourçons ont été comparées dans une étude de cas utilisant le Fipronil dont les effets avaient déjà été démontrés en conditions semi-contrôlées (cf. partie 3). Les résultats ont, tout d'abord, montré que la méthode d'élevage avait une incidence non seulement sur fertilité, comme cela a été démontré précédemment (cf. partie 2), mais aussi sur la survie et la maturité des mâles. Malgré cela, le toxique a affecté de façon équivalente la fertilité des individus maintenus en conditions contrôlées et semi-contrôlées. Le fait que les effets de l'insecticide soient observés chez des individus exposés dans deux conditions expérimentales différentes confirme son caractère reprotoxique vis-à-vis de l'abeille et rend l'observation de ces effets beaucoup moins contestable. De plus, dans ce cas, la reproductibilité de ces effets, quelle que soit l'approche, souligne la pertinence des études conduites en laboratoire, études souvent contestées et dénoncées par les firmes phytopharmaceutiques comme étant non représentatives de la réalité. Ainsi, ces travaux pourraient constituer la base de futures procédures d'évaluation des effets toxiques des pesticides pour la fonction de reproduction chez l'abeille domestique. Il faut cependant garder à l'esprit que les approches proposées ne permettent pas d'évaluer tous les dangers liés à l'utilisation des pesticides sur la reproduction de l'abeille. En effet, les démarches présentées ne couvrent qu'une exposition des mâles au stade adulte où les spermatozoïdes sont déjà produits. Aussi, il semble important de considérer une potentielle exposition des mâles durant la phase de développement pendant laquelle la spermatogénèse se produit. Par ailleurs, il ne faut pas exclure qu'une exposition des reines pourrait également être un facteur aggravant. Ainsi, même si cette étude laisse entrevoir certaines lacunes concernant l'évaluation des effets reprotoxiques des substances phytopharmaceutiques vis-à-vis de l'abeille, elle fournit une première base pour évaluer ces effets chez les mâles. De nombreuses démarches restent encore à effectuer avant la mise en place d'une procédure d'évaluation dans un cadre réglementaire.

Partie 5

Synthèse et perspectives

Rappel

Les troubles de la reproduction, liés à l'omniprésence dans l'environnement des stressseurs biotiques et abiotiques, sont des phénomènes généralisés dans le règne animal affectant non seulement les vertébrés mais aussi les invertébrés. La fonction de reproduction étant essentielle à la pérennité des espèces, son atteinte par des facteurs environnementaux pourrait aboutir au déclin de ces dernières, voire leur extinction (Carson 1962, Miller et al. 2004). Actuellement, de nombreuses espèces sont en déclin voire menacées d'extinction à travers le monde dont les insectes pollinisateurs (Potts et al. 2010, Nieto et al. 2014, Goulson et al. 2015, IUCN 2015). Concernant l'abeille domestique, les causes du déclin ont été largement investiguées (Neumann and Carreck 2010, vanEngelsdorp and Meixner 2010). Cependant, peu d'études ont considérées les troubles de la reproduction potentiellement induits par les stressseurs environnementaux pour expliquer ce déclin. En effets, la grande majorité des études se sont, jusqu'à présent, focalisées sur les ouvrières et ont délaissé les reproducteurs qui sont des individus clé au sein des colonies, dont les mâles de par la qualité et la diversité du sperme qu'ils transmettent à la reine. Ce constat est sûrement explicable par le manque d'outils d'investigation et, notamment, d'outils d'élevage et d'exposition des faux-bourçons lié à la grande difficulté d'élever ces individus. Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'évaluer les conséquences d'expositions des faux-bourçons aux stressseurs environnementaux et les implications de ces expositions dans le phénomène d'appauvrissement de la qualité des reines observé ces dernières années et suspecté d'être une cause du déclin des colonies d'abeilles (vanEngelsdorp et al. 2008, Brodschneider et al. 2010, Genersch et al. 2010, vanEngelsdorp and Meixner 2010).

Stratégies de recherche mises en œuvre

Dans le but de remplir les objectifs fixés, des dispositifs expérimentaux d'élevage des mâles, en conditions de laboratoire et semi-contrôlées, ont été mis au point. Pour la première fois, nous avons réussi à maintenir des mâles d'abeilles de la naissance à la maturité sexuelle dans des conditions permettant d'évaluer sur ces derniers les effets de stressseurs biotiques et abiotiques en considérant non seulement la physiologie mais aussi la fertilité des individus. Si un protocole d'élevage en conditions semi-contrôlées a été

rapidement utilisable, le protocole d'élevage en conditions de laboratoire a nécessité plusieurs années de développement avant d'aboutir à un outil fiable. Ceci explique en partie la stratégie de privilégier une approche en conditions semi-contrôlées pour exposer les mâles à différents facteurs de stress. Suite aux expositions aux facteurs de stress, des stratégies complémentaires ont été mises en œuvre pour investiguer les effets de ces stressseurs sur les faux-bourçons. Les effets sur les individus ont été étudiés par un suivi des traits d'histoires de vie (survie, maturité sexuelle, volume de semence produit). Les effets des stressseurs sur la qualité des semences ont été étudiés à l'aide de techniques de biologie cellulaire pour évaluer le nombre et la mortalité des spermatozoïdes dans le sperme. Ces techniques ont dû faire l'objet d'une mise au point pour être adaptées à notre modèle d'étude. De plus, des techniques biochimiques, avec une approche multi-marqueurs, ont été utilisées pour évaluer, dans différents compartiments biologiques du mâle (tête, intestin, abdomen et sperme), les altérations des grandes fonctions physiologiques telles que les fonctions neurales, immunitaires, anti-oxydantes, détoxifiantes et métaboliques selon les compartiments étudiés (Weirich et al. 2002, Al-Lawati et al. 2009, Alaux et al. 2010, Dussaubat et al. 2012, Badiou-Beneteau et al. 2013, Carvalho et al. 2013, Di Pasquale et al. 2013, Dussaubat et al. 2016). Concernant l'évaluation des effets d'une exposition des mâles sur le potentiel reproducteur des reines, l'insémination instrumentale, un maintien en conditions de laboratoire et l'analyse des spermathèques après dissection ont été privilégiés. La technique d'insémination instrumentale des reines a comme avantage de permettre un contrôle du volume de semence fourni à chacune d'elles et de ne pas affecter pas leurs performances (Cobey 2007, Cobey et al. 2013). Le maintien en cagettes avec des accompagnatrices et de la cire, en conditions de laboratoire, a l'avantage d'éviter toute exposition à un stress environnemental et de permettre un suivi journalier du comportement. Entre autres, un comportement de ponte a pu être observé suite aux inséminations, témoignant ainsi de l'efficacité des manipulations réalisées. L'analyse du contenu des spermathèques est un indicateur pertinent de la qualité des reines car la qualité du sperme stocké est essentielle à la production de couvain d'ouvrières et à la longévité des reines. Ces stratégies d'étude, ont été privilégiées suite à la réintroduction non fructueuse des reines au sein de colonies dont l'objectif était d'évaluer, *in situ*, les performances et la longévité de ces dernières. Ne pas avoir pu approfondir les conséquences d'une exposition des mâles à l'échelle coloniale reste un regret majeur dans la réalisation de ce travail de thèse.

Bilan des travaux

L'ensemble des outils développés a permis d'étudier les effets sur les faux-bourçons d'un stresser chimique, l'insecticide Fipronil, et d'un parasite intracellulaire de l'intestin d'abeille, *Nosema ceranae*. Les travaux réalisés ont révélé que ces deux stressers avaient la capacité d'affecter différemment les fonctions physiologiques des individus se traduisant par des effets localisés à l'intestin chez les individus infectés par *N. ceranae* et généralisés à tout l'organisme chez les individus exposés au Fipronil à une concentration environnementale. L'association des deux stressers a également montré des effets synergiques sur l'état physiologique global des mâles allant jusqu'à compromettre leur survie comme cela avait été observé chez les ouvrières (Vidau et al. 2011, Aufauvre et al. 2012). L'étude des paramètres de fertilité a montré des altérations induites par le Fipronil seul, *N. ceranae* seul et l'association des stressers sans montrer d'effets synergiques. Ces observations semblent indiquer que la fonction de reproduction des mâles est particulièrement sensible aux différentes situations de stress. Les altérations observées se traduisaient notamment par une baisse de la concentration en spermatozoïdes dans les semences, des altérations du métabolisme et des défenses anti-oxydantes. Des études plus poussées sur les effets du Fipronil ont montré que l'insecticide affectait clairement la viabilité des spermatozoïdes. Ces travaux ont permis de confirmer la première hypothèse émise au début de ce travail de recherche, à savoir que les insecticides systémiques et les parasites, associés ou non, pouvaient affecter l'intégrité physiologique des mâles dont leur fonction reproductrice.

L'insémination instrumentale des reines avec des semences altérées de mâles exposés au Fipronil a montré une diminution de la qualité des semences stockées dans leur spermathèque. Les reines détenaient non seulement moins de spermatozoïdes mais ceux-ci présentaient une viabilité moindre. Si ces résultats peuvent paraître évidents puisque le sperme de mâles exposés présentait les mêmes caractéristiques, ils n'étaient pas forcément attendus. En effet, la reine reçoit une quantité excédentaire de spermatozoïdes et n'en stocke qu'une infime partie (Woyke 1962). De plus, le stockage des spermatozoïdes dans la spermathèque met en jeu des mécanismes complexes afin de sélectionner les meilleurs d'entre eux et éliminer les morts (Ruttner and Koeniger 1971, Gessner and Ruttner 1977, Collins 2000, Gencer and Kahya 2011). De ce fait, quelle que soit la qualité des semences reçues, la qualité des spermatozoïdes stockés aurait pu ne pas être affectée. Cependant, nos résultats ont montré que la viabilité des spermatozoïdes reçus par la reine, suite à

l'insémination, affectait le nombre des spermatozoïdes sans être corrélée à la viabilité des spermatozoïdes stockés. Ce constat semble indiquer que la mortalité des spermatozoïdes observée dans la spermathèque est liée aux effets d'une exposition antérieure des mâles au Fipronil qui se poursuivent même après l'arrêt de la pression du stresser. Ainsi, les altérations métaboliques des spermatozoïdes induites par le Fipronil pourraient, au sein de la spermathèque, empêcher les modifications métaboliques nécessaires à la conservation à long terme (Poland et al. 2011) et/ou augmenter la dynamique de mortalité au cours du temps, qui est un phénomène qui s'opère naturellement (Lodesani et al. 2004). En conséquence, une exposition des mâles au Fipronil conduit à une altération des mécanismes de sélection des meilleures semences retenues par les reines. De ce fait, un individu non exposé peut subir les conséquences d'une exposition de son partenaire sexuel. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle une baisse de qualité des mâles exposés aux stressers environnementaux pourrait se traduire par des effets délétères sur le potentiel reproducteur des reines non-exposées a pu être vérifiée.

Nos travaux vont dans le même sens que des études parues récemment montrant des effets de *Nosema spp* (Peng et al. 2015, Roberts et al. 2015) et des néonicotinoïdes (Straub et al. 2016) sur la fertilité des mâles qui s'ajoutent aux études plus anciennes sur le parasite *Varroa destructor* et les traitements sanitaires utilisés pour le réguler (DelCacho et al. 1996, Rinderer et al. 1999, Sylvester et al. 1999, Collins and Pettis 2001, Duay 2002, Burley et al. 2008). Cependant, nos travaux vont plus loin puisqu'ils démontrent clairement une incidence de l'exposition des mâles sur les reines. Cela a permis de confirmer les soupçons selon lesquels une pénurie de mâles en bonne santé pourrait être responsable d'un appauvrissement des reines (Camazine et al. 1998, Rhodes and Somerville 2003).

Interrogations et perspectives

Les travaux réalisés ont apportés des réponses concernant les troubles de la reproduction de l'abeille mais soulèvent de nombreuses interrogations à différentes échelles.

Au niveau des semences

Dans nos études, les semences des mâles exposés présentaient des modulations de certains marqueurs du métabolisme et du stress oxydant. Or, le stress oxydant peut conduire, au niveau des spermatozoïdes, à des altérations structurelles de l'ADN et des membranes phospholipidiques dont l'intégrité est essentielle à la fusion des noyaux des gamètes et, par la suite, au développement embryonnaire (Agarwal et al. 2003, Khan et al. 2015). Dans le cas de l'abeille, ces altérations structurelles pourraient être la conséquence d'un avortement d'une partie du couvain d'ouvrières qui se traduit par du couvain lacunaire et/ou le développement de l'œuf en individu mâle haploïde. Ainsi, l'adaptation de tests existants déjà sur d'autres modèles d'étude, permettrait une évaluation de l'intégrité de l'ADN et des membranes phospholipidiques et fournirait des informations intéressantes dans le cadre d'études comme celles que nous avons réalisées. L'intégrité de l'ADN pourrait être analysée, par exemple, au moyen du test de « comète » ou d'un test de coloration à l'acridine orange qui permettent d'évaluer le taux de fragmentation et la dénaturation des brins d'ADN, respectivement. L'intégrité des membranes phospholipidiques pourrait être approchée en étudiant le taux de peroxydation lipidique qui reflète une altération des structures membranaires liée à un stress oxydatif au moyen d'un test de réaction à l'acide thiobarbiturique (T-BARS). Ainsi, il aurait été intéressant de savoir si le Fipronil altérait les structures cellulaires des faux-bourçons de la même façon que chez le rat (Khan et al. 2015). L'approche protéomique pourrait également être intéressante en fournissant un aperçu global des effets induits par différents stressseurs ou conditions environnementales au niveau des spermatozoïdes, du liquide séminal ou du liquide spermathéal (Collins et al. 2006, Baer et al. 2009, Poland et al. 2011). En outre, cette approche permettrait également d'identifier des réseaux métaboliques impliqués dans les dysfonctionnements ou la dégénérescence des spermatozoïdes.

Au niveau du faux-bourdon

Les approches utilisées nous ont permis d'exposer les mâles, de la naissance à la maturité sexuelle, pendant la phase de maturation des spermatozoïdes intervenant après la spermatogénèse qui se produit au stade larvaire. Il aurait été intéressant de considérer les effets sur la fertilité d'une exposition aux pesticides durant les stades de développement en complément du stade adulte. L'ébauche d'un dispositif expérimental d'élevage des mâles en conditions de laboratoire de l'œuf à l'âge adulte a été entreprise dans ce sens mais n'a pas encore abouti à l'émergence d'individus. Ainsi, ce dispositif permettrait d'exposer les faux-bourdons pendant leurs stades de développement larvaire et éviterait, ainsi, une exposition de colonies entières *in situ*, comme cela a pu être pratiqué dans certaines études sur les mâles dont le but était d'évaluer les effets des néonicotinoïdes (Ciereszko et al. 2016, Straub et al. 2016). Contrairement à une approche en milieu contrôlé, ces études ont présenté un risque élevé de contamination de l'environnement. De plus, des facteurs de stress non désirés peuvent également survenir comme des expositions à d'autres stressseurs présents au sein des colonies, un stress alimentaire, un stress climatique et des phénomènes internes de régulation de la ruche. De plus, il est intéressant de noter qu'un dispositif en conditions contrôlées pourrait également être adapté aux reines.

Les altérations des fonctions physiologiques observées chez les mâles exposés au Fipronil et l'association Fipronil/*N. ceranae* soulèvent des interrogations concernant la capacité de ces derniers à s'accoupler et à transmettre leur patrimoine génétique et sur l'intégrité des semences. En effet, la sélection naturelle qui s'opère lors des accouplements pourrait effectivement jouer en la défaveur des mâles dont les fonctions motrices ou cognitives auraient pu être potentiellement affectées par toute sorte de contaminants. Pour répondre à ces interrogations, le succès d'accouplement des individus exposés pourrait être apprécié par une évaluation quantitative de leur descendance à l'aide de marqueurs génétiques au préalable identifiés et discriminant différentes lignées de mâles comme cela a déjà été réalisé dans de précédentes études (Sylvester et al. 1999, Kraus et al. 2003).

Au niveau des reines

L'insémination instrumentale de reines, avec des semences altérées de faux-bourçons exposés au Fipronil, a montré des effets sur le contenu des spermathèques 15 jours après l'insémination. Cependant, les résultats observés ne peuvent pas être généralisés à tous les stressseurs. Il est possible que ces résultats soient seulement liés aux modes d'action spécifiques de l'insecticide. Ainsi, si d'autres stressseurs chimiques ou biologiques, comme *N. ceranae*, ont la capacité d'affecter la fertilité des mâles, il serait intéressant de savoir si leurs conséquences sur les reines sont similaires à celles observées avec le Fipronil. Comme, la qualité du sperme de la spermathèque évolue naturellement au cours du temps (Lodesani et al. 2004), la cinétique de mortalité des spermatozoïdes dans la spermathèque pourrait en être affectée. En effet, si la surmortalité des spermatozoïdes observée dans les spermathèques de reines ayant reçu des semences altérées peut s'être stabilisée au moment où les analyses ont été effectuées (15 jours post insémination), il se peut que ces spermatozoïdes subissent toujours une dégénérescence accélérée par la suite. Par ailleurs, il est possible que la qualité du sperme stocké entraîne des perturbations physiologiques des reines incluant des altérations des profils phénotypiques essentiels à la régulation de la colonie (Richard et al. 2007). Ceci aurait pour conséquences d'affecter un peu plus la performance des reines et d'accélérer leur renouvellement. Des inséminations de reines avec des semences de mâles exposés à différents stressseurs et des analyses du contenu des spermathèques à différents temps pourraient apporter des réponses à ces interrogations.

Des investigations destinées à comprendre complètement les mécanismes de transfert du sperme pour fertiliser les œufs sont aussi nécessaires pour appréhender les causes de défaillance des reines. En effet, les mécanismes de sélection des spermatozoïdes pour fertiliser les œufs sont peu connus. Si la reine ne libère que quelques spermatozoïdes pour réaliser ce processus de fertilisation (Baer et al. 2016), il n'est pas sûr que tous soient viables. Des marquages de spermatozoïdes, présents avec des œufs fraîchement pondus, au moyen de colorants discriminant les spermatozoïdes morts des vivants et une observation en microscopie de fluorescence pourraient apporter une réponse à cette incertitude.

Enfin, bien que nos études n'aient considéré que l'exposition des mâles, les reines et leur potentiel reproducteur peuvent être directement affectés par une exposition aux stressseurs environnementaux (Collins and Pettis 2013, Sandrock et al. 2014, Dussaubat et

al. 2016). Ainsi, les prochaines études pourraient considérer des expositions à la fois des reines et des mâles.

Au niveau colonial

Les interrogations concernant les effets à l'échelle coloniale d'une exposition des mâles sont multiples. En effet, les colonies peuvent être impactées au niveau (i) de la production quantitative ou qualitative de couvain d'ouvrières, essentielle au développement et à la résilience de celles-ci face au stress et (ii) du renouvellement prématuré des reines qui est une étape critique dans le cycle de vie d'une colonie. Des réponses pourraient être apportées par un suivi rigoureux de colonies se traduisant par des observations régulières de la quantité de couvain, de population et de réserves engrangées, pouvant ainsi révéler des signes de défaillance des reines, mais aussi par des observations de renouvellement des reines et des pertes hivernales et estivales des colonies.

Au niveau apicole

Les résultats de nos études et ceux publiés récemment soulignent l'importance des reproducteurs dans la gestion des cheptels. La mise en place de programmes de sélection de lignées produisant des mâles avec une qualité de semence optimale, et une optimisation de l'élevage des reproducteurs en général, pourraient contribuer à l'amélioration de la qualité des reines et des colonies qui en sont issues. Entre autres, (i) des contrôles de la qualité des cires afin de minimiser leur contamination, (ii) des contrôles de l'état sanitaire et de l'environnement des élevages pour minimiser les effets néfastes des parasites et des polluants environnementaux, et (iii) une attention portant sur les ressources alimentaires disponibles, pourraient améliorer la qualité et le rendement des cheptels.

Conclusion

Les troubles de la reproduction de l'abeille, et plus particulièrement une baisse de fertilité des mâles qui sont exposés à une multitude de polluants environnementaux et de parasites au sein des colonies, expliqueraient en partie l'appauvrissement de la qualité des reines observé ces dernières années. Ainsi, de nouveaux arguments confortent l'hypothèse de l'importance de l'atteinte de la fertilité dans le phénomène de déclin des populations d'abeilles. Cependant, même si les effets des stressseurs environnementaux sur les reproducteurs sont de plus en plus étudiés, que ce soit sur les mâles ou sur les reines, de nombreux travaux de recherche doivent être encore conduits afin que la part de responsabilité des troubles de la reproduction dans ce déclin soit pleinement appréhendée. Concernant les substances phytopharmaceutiques, l'apport de nouvelles données scientifiques considérant des expositions à différents stades du développement, la compréhension de leurs modes d'action et la mise au point d'outils d'investigation comme ceux que nous proposons, permettront peut-être dans l'avenir, au niveau réglementaire, une évaluation des effets reprotoxiques d'une substance avant sa mise sur le marché.

Références bibliographiques

Agarwal, A., Saleh, R. A. and Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79 (4), 829-843. DOI: 10.1016/S0015-0282(02)04948-8.

Al-Lawati, H., Kamp, G. and Bienefeld, K. (2009). Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *J. Insect Physiol.* 55 (2), 116-121. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.10.010.

Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P. and Le Conte, Y. (2010). Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12 (3), 774-782. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.

Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J. L. and Le Conte, Y. (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 106 (3), 380-385. DOI: 10.1016/j.jip.2010.12.005.

Alumot, E., Lensky, Y. and Holstein, P. (1969). Sugars and trehalase in the reproductive organs and hemolymph of the queen and drone honey bees (*Apis mellifica* L. var. *Ligustica* spin.). *Comp. Biochem. Physiol.* 28 (3), 1419-1425. DOI: 10.1016/0010-406X(69)90579-9.

Alves, P. R. L., Cardoso, E., Martines, A. M., Sousa, J. P. and Pasini, A. (2013). Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere* 90 (11), 2674-2682. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.

Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vignes, B., Belzunces, L. P., Delbac, F. and Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 326. DOI: 10.1038/srep00326.

Auger, J., Kunstmann, J. M., Czyglik, F. and Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* 332 (5), 281-285. DOI: 10.1056/nejm199502023320501.

Badiou-Beneteau, A., Benneveau, A., Geret, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J. L., Reynaud, B. and Belzunces, L. P. (2013). Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int.* 60, 31-41. DOI: 10.1016/j.envint.2013.07.002.

Baer, B., Collins, J., Maalaps, K. and den Boer, S. P. A. (2016). Sperm use economy of honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Ecol. Evol.*, DOI: 10.1002/ece3.2075.

Baer, B., Heazlewood, J. L., Taylor, N. L., Eubel, H. and Millar, A. H. (2009). The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics* 9 (8), 2085-2097. DOI: 10.1002/pmic.200800708.

- Baer, B. and Schmid-Hempel, P. (1999). Experimental variation in polyandry affects parasite loads and fitness in a bumble-bee. *Nature* 397 (6715), 151-154. DOI.
- Barganska, Z., Slebioda, M. and Namiesnik, J. (2016). Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 46 (3), 235-248. DOI: 10.1080/10643389.2015.1078220.
- Baudry, E., Solignac, M., Garnery, L., Gries, M., Cornuet, J. and Koeniger, N. (1998). Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation. *Proc. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci.* 265 (1409), 2009-2014. DOI: 10.1098/rspb.1998.0533.
- Bauer, L. S. and Nordin, G. L. (1989). Effect of nosema-fumiferanae (microsporida) on fecundity, fertility, and progeny performance of choristoneura-fumiferana (lepidoptera, tortricidae). *Environ. Entomol.* 18 (2), 261-265. DOI: 10.1093/ee/18.2.261.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P. M., Reemer, M., Ohlemuller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A. P., Potts, S. G., Kleukers, R., Thomas, C. D., Settele, J. and Kunin, W. E. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313 (5785), 351-354. DOI: 10.1126/science.1127863.
- Blum, M. S. and Taber, S. (1965). Chemistry of the drone honey bee reproductive system—III. Dehydrogenases in washed spermatozoa. *J. Insect Physiol.* 11 (11), 1489-1501. DOI: 10.1016/0022-1910(65)90165-4.
- Boes, K. E. (2010). Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. *Insect. Soc.* 57 (1), 1-9. DOI: 10.1007/s00040-009-0046-9.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie* 37 (1), 1-18. DOI: 10.1051/apido:2005043.
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N. and Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int* 22 (1), 35-67. DOI: 10.1007/s11356-014-3332-7.
- Brennan, L. J., Haukedal, J. A., Earle, J. C., Keddie, B. and Harris, H. L. (2012). Disruption of redox homeostasis leads to oxidative DNA damage in spermatocytes of Wolbachia-infected *Drosophila simulans*. *Insect. Mol. Biol.* 21 (5), 510-520. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2012.01155.x.
- Brodtschneider, R., Moosbeckhofer, R. and Crailsheim, K. (2010). Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. *J. Apic. Res.* 49 (1), 23-30. DOI: 10.3896/ibra.1.49.1.04.
- Burley, L. M., Fell, R. D. and Saacke, R. G. (2008). Survival of honey bee (Hymenoptera : Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. *J. Econ. Entomol.* 101 (4), 1081-1087. DOI: 10.1093/jee/101.4.1081.
- Camazine, S., Cakmak, I., Cramp, K., Finley, J., Fisher, J., Frazier, M. and Rozo, A. (1998). How healthy are commercially-produced US honey bee queens? *Am. Bee J.* 138 (9), 677-680.

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit. Med. J.* 305 (6854), 609-613. DOI: 10.1136/bmj.305.6854.609.

Carson, R. (1962). *Silent spring*. Boston, Editions Houghton Mifflin.

Carvalho, S. M., Belzunces, L. P., Carvalho, G. A., Brunet, J. L. and Badiou-Beneteau, A. (2013). Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 32 (9), 2117-2124. DOI: 10.1002/etc.2288.

Chaimanee, V., Evans, J. D., Chen, Y. P., Jackson, C. and Pettis, J. S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Physiol.* 89, 1-8. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2016.03.004.

Chandler, G. T., Cary, T. L., Volz, D. C., Walse, S. S., Ferry, J. L. and Klosterhaus, S. L. (2004). Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (1), 117-124. DOI: 10.1897/03-124.

Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S. and Karol, H. (2016). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 1-12. DOI: 10.1007/s13592-016-0466-2.

Cobey, S. W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38 (4), 390-410. DOI: 10.1051/apido:2007029.

Cobey, S. W., Tarpy, D. R. and Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 52 (4), 1-18. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.09.

Cole, L. M., Nicholson, R. A. and Casida, J. E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic. Biochem. Phys.* 46 (1), 47-54. DOI: 10.1006/pest.1993.1035.

Colin, M. E. and Belzunces, L. P. (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L - a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36 (2), 115-119. DOI: 10.1002/ps.2780360206.

Collins, A. M. (2000). Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31 (3), 421-429. DOI: 10.1051/apido:2000132.

Collins, A. M., Caperna, T. J., Williams, V., Garrett, W. M. and Evans, J. D. (2006). Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* 15 (5), 541-549. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2006.00674.x.

Collins, A. M. and Donoghue, A. M. (1999). Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology* 51 (8), 1513-1523. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00094-1.

Collins, A. M. and Pettis, J. S. (2001). Effect of varroa infestation on semen quality. *Am. Bee J.* 141 (8), 590-593.

Collins, A. M. and Pettis, J. S. (2013). Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* 44 (3), 351-356. DOI: 10.1007/s13592-012-0186-1.

Costa, M. A., Moscardini, V. F., Gontijo, P. D., Carvalho, G. A., de Oliveira, R. L. and de Oliveira, H. N. (2014). Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology* 23 (8), 1399-1408. DOI: 10.1007/s10646-014-1282-y.

Da Cruz-Landim, C. (2009). Aparelho reprodutor e gametogênese. ABELHAS : Morfologia e função de sistemas. UNESP. São Paulo.

Dade, H. A. (1994). Anatomy and Dissection of the Honeybee. Cardiff, International Bee Research Association.

de Medeiros, H. C. D., Constantin, J., Ishii-Iwamoto, E. L. and Mingatto, F. E. (2015). Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. *Toxicol. Lett.* 236 (1), 34-42. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.04.016.

DelCacho, E., Marti, J. I., Josa, A., Quilez, J. and SanchezAcedo, C. (1996). Effect of *Varroa jacobsoni* parasitization in the glycoprotein expression on *Apis mellifera* spermatozoa. *Apidologie* 27 (2), 87-92. DOI: 10.1051/apido:19960203.

Desneux, N., Decourtye, A. and Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52, 81-106. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.

Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J. L. and Alaux, C. (2013). Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *Plos One* 8 (8), DOI: 10.1371/journal.pone.0072016.

Duay, P. (2002). Relation between the level of preimaginal infestation by the broodmite *Varroa destructor* and adult life expectancy in drone honeybees (Hymenoptera : Apidae : *Apis mellifera*). *Entomol. Gen.* 26 (3), 213-218. DOI: 10.1127/entom.gen/26/2002/213.

Dussaubat, C., Brunet, J. L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. H., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L. P., Moritz, R. F., Le Conte, Y. and Alaux, C. (2012). Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7 (5), e37017. DOI: 10.1371/journal.pone.0037017.

Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Tchamitchian, S., Bonnet, M., Cousin, M., Kretzschmar, A., Brunet, J. L. and Le Conte, Y. (2016). Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Sci. Rep.* 6, DOI: 10.1038/srep31430.

EC (1991). Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC). Brussels, Off. J. Eur. Com. L 230.

EC (2009). Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Brussels, Off. J. Eur. Union L 309.

EC (2013). Bee Health: EU takes additional measures on pesticides to better protect Europe's bees. Brussels.

ECHA (2016). Evaluation under REACH: progress report 2015, European chemicals agency.

EFSA (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA Journal* 11 (5), 1-51. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3158.

EPPO (2010). PP 1/170 (4): Side-effects on honeybees. *EPPO Bulletin* 40 (3), 313-319. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2010.02418.x.

FranceAgriMer (2012). Audit économique de la filière apicole française. **1**: 1-32.

Franck, P., Coussy, H., Le Conte, Y., Solignac, R., Garnery, L. and Cornuet, J. M. (1999). Microsatellite analysis of sperm admixture in honeybee. *Insect Molecular Biology* 8 (3), 419-421. DOI: 10.1046/j.1365-2583.1999.83131.x.

Franck, P., Solignac, M., Vautrin, D., Cornuet, J. M., Koeniger, G. and Koeniger, N. (2002). Sperm competition and last-male precedence in the honeybee. *Anim. Behav.* 64, 503-509. DOI: 10.1006/anbe.2002.3078.

Gauthier, L., Ravallec, M., Tournaire, M., Cousserans, F., Bergoin, M., Dainat, B. and de Miranda, J. R. (2011). Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. queens. *PLoS One* 6 (1), e16217. DOI: 10.1371/journal.pone.0016217.

Gencer, H. V. and Kahya, Y. (2011). The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *J. Apic. Res.* 50 (3), 190-194. DOI: 10.3896/ibra.1.50.3.02.

Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter, W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G. and Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41 (3), 332-352. DOI: 10.1051/apido/2010014.

Gessner, B. and Gessner, K. (1976). Inorganic ions in spermathecal fluid and their transport across the spermathecal membrane of the queen bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 22 (11), 1469-1474. DOI: 10.1016/0022-1910(76)90212-2.

Gessner, B. and Ruttner, F. (1977). Transfer of spermatozoa into spermatheca of honey bee queen. *Apidologie* 8 (1), 1-18. DOI: 10.1051/apido:19770101.

Gibbons, D., Morrissey, C. and Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (1), 103-118. DOI: 10.1007/s11356-014-3180-5.

- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. and Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347 (6229), 1255-957. DOI: 10.1126/science.1255957.
- Guillette, L. J., Jr. and Guillette, E. A. (1996). Environmental contaminants and reproductive abnormalities in wildlife: implications for public health? *Toxicol. ind. health* 12 (3-4), 537-550.
- Haberl, M. and Tautz, D. (1998). Sperm usage in honey bees. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42 (4), 247-255. DOI: 10.1007/s002650050436.
- Habert, R., Livera, G. and Rouiller-Fabre, V. (2014). Toxicologie de la reproduction. La reproduction animale et humaine. M. Saint-Dizier and S. Chastant-Maillard. Versailles cedex, France, Editions Quae, 507-531.
- Harbo, J. R. (1979). The Rate of Depletion of Spermatozoa in the Queen Honeybee Spermatheca. *J. Apic. Res.* 18 (3), 204-207. DOI: 10.1080/00218839.1979.11099969.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R. and Meana, A. (2010). Nosema ceranae in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41 (3), 375-392. DOI: 10.1051/apido/2010019.
- Hornshaw, T. C., Aulerich, R. J. and Johnson, H. E. (1983). Feeding great lakes fish to mink: Effects on mink and accumulation and elimination of PCBS by mink. *J. Toxicol. Environ. Health* 11 (4-6), 933-946. DOI: 10.1080/15287398309530396.
- Hosken, D. J. and Stockley, P. (2003). Benefits of Polyandry: A Life History Perspective. *Evol. Biol.* R. J. Macintyre and M. T. Clegg. Boston, MA, Springer US, 173-194.
- INSERM (2012). Les troubles de la fertilité: Etat des connaissances et pistes pour la recherche, Institut national de la santé et de la recherche médicale.
- IUCN. (2015). Red list of threatened species. Version 2015.4 (IUCN, 2015, www.iucnredlist.org).
- Kaftanoglu, O. and Peng, Y.-S. (1984). Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen. *J. Apic. Res.* 23 (3), 157-163. DOI: 10.1080/00218839.1984.11100625.
- Khan, S., Jan, M. H., Kumar, D. and Telang, A. G. (2015). Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 124, 8-14. DOI: 10.1016/j.pestbp.2015.03.010
- King, M., Eubel, H., Millar, A. H. and Baer, B. (2011). Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 57 (3), 409-414. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.12.011.
- Kitulagodage, M., Buttemer, W. A. and Astheimer, L. B. (2011). Adverse effects of fipronil on avian reproduction and development: maternal transfer of fipronil to eggs in zebra finch *Taeniopygia guttata* and in ovo exposure in chickens *Gallus domesticus*. *Ecotoxicology* 20 (4), 653-660. DOI: 10.1007/s10646-011-0605-5.

- Knight, A. L. and Flexner, L. (2007). Disruption of mating in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) by chlorantranilipole, an anthranilic diamide insecticide. *Pest Manag. Sci.* 63 (2), 180-189. DOI: 10.1002/ps.1318.
- Koeniger, G. (1986). Reproduction and Mating Behavior. *Bee Genetics and Breeding*. T. E. Rinderer, Academic Press, INC, 255-280.
- Kraus, F. B., Neumann, P., Scharpenberg, H., Van Praagh, J. and Moritz, R. F. A. (2003). Male fitness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.). *J. Evol. Biol.* 16 (5), 914-920. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2003.00593.x.
- Laidlaw, H. H. and Page, R. E. (1984). Polyandry in honey bees (*Apis-mellifera* L) - Sperm Utilization And Intracolony Genetic-Relationships. *Genetics* 108 (4), 985-997.
- Laronda, M. M., Unno, K., Butler, L. M. and Kurita, T. (2012). The development of cervical and vaginal adenosis as a result of diethylstilbestrol exposure in utero. *Differentiation* 84 (3), 252-260. DOI: 10.1016/j.diff.2012.05.004.
- Laycock, I., Lenthall, K. M., Barratt, A. T. and Cresswell, J. E. (2012). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* 21 (7), 1937-1945. DOI: 10.1007/s10646-012-0927-y.
- Lensky, Y., Ben-David, E. and Schindler, H. (1979). Ultrastructure of the Spermatozoon of the Mature Drone Honeybee. *J. Apic. Res.* 18 (4), 264-271. DOI: 10.1080/00218839.1979.11099981.
- Lensky, Y. and Schindler, H. (1967). Motility and reversible inactivation of honeybee spermatozoa in vivo and in vitro. *Ann. Abeille* 10 (1), 5-16. DOI: 10.1051/apido:19670101.
- Lodesani, M., Balduzzi, D. and Galli, A. (2004). A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. *J. Apic. Res.* 43 (1), 27-28. DOI: 10.1080/00218839.2004.11101105.
- Mattila, H. R. and Seeley, T. D. (2007). Genetic Diversity in Honey Bee Colonies Enhances Productivity and Fitness. *Science* 317 (5836), 362-364. DOI: 10.1126/science.1143046.
- Mayack, C. and Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invert. Pathol.* 100 (3), 185-188. DOI: 10.1016/j.jip.2008.12.001.
- McCallum, M. L., Matlock, M., Treas, J., Safi, B., Sanson, W. and McCallum, J. L. (2013). Endocrine disruption of sexual selection by an estrogenic herbicide in the mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Ecotoxicology* 22 (10), 1461-1466. DOI: 10.1007/s10646-013-1132-3.
- Miller, D., Summers, J. and Silber, S. (2004). Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertil. Steril.* 81 (4), 954-964. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.09.051.
- Misra, S., Singh, A., C, H. R., Sharma, V., Reddy Mudiam, M. K. and Ram, K. R. (2014). Identification of *Drosophila*-based endpoints for the assessment and understanding of

xenobiotic-mediated male reproductive adversities. *Toxicol. Sci.* 141 (1), 278-291. DOI: 10.1093/toxsci/kfu125.

Moritz, R. F. A. (1986). Intracolony worker relationship and sperm competition in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Experientia* 42 (4), 445-448. DOI: 10.1007/bf02118652.

Multigner, L., Kadhel, P., Rouget, F., Blanchet, P. and Cordier, S. (2016). Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. *Environ. Sci. Pollut. R.* 23 (1), 3-8. DOI: 10.1007/s11356-015-4621-5.

Nelson, C. M. K. and Bunge, R. G. (1974). Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil. Steril.* 25 (6), 503-507.

Neumann, P. and Carreck, N. (2010). Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49 (1), 1-6. DOI: 10.3896/ibra.1.49.1.01.

Nicodemo, D., Maioli, M. A., Medeiros, H. C. D., Guelfi, M., Balieira, K. V. B., De Jong, D. and Mingatto, F. E. (2014). Fipronil and Imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (9), 2070-2075. DOI: 10.1002/etc.2655.

Nieto, A., Roberts, S. P. M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., Biesmeijer, J. C., Bogusch, P., Dathe, H. H., De la Rúa, P., De Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Ortiz-Sánchez, F. J., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S. G., Praz, C., Quaranta, M., Radchenko, V. G., Scheuchl, E., Smit, J., Straka, J., Terzo, M., Tomozii, B., Window, J. and Michez, D. (2014). European Red List of bees. Luxembourg: Publication Office of the European Union.

OECD (1998). Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. Paris, OECD Publishing, 1-8.

OECD (1998). Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. Paris, OECD Publishing, 1-7.

OECD (2013). Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems. Paris, OECD Publishing, 1-10.

OECD (2014). Test No. 75: Guidance Document on the Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Brood test Under Semi-field Conditions. OECD Series on Testing and Assessment. Paris, OECD Publishing.

Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey Bees? *Plos Biol.* 5 (6), 1195-1199. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050168.

Oldroyd, B. P. and Fewell, J. H. (2008). Large fitness benefits from polyandry in the honey bee, *Apis mellifera*. *Trends. Ecol. Evol.* 23 (2), 59-60. DOI: 10.1016/j.tree.2007.10.012.

Oliva, A., Spira, A. and Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum. Reprod.* 16 (8), 1768-1776. DOI: 10.1093/humrep/16.8.1768.

- Olooto, W. E., Ambali, A. and Banjo, T. A. (2012). A review of female infertility: important etiological factors and management. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 2, 379-385.
- Page, R. E. and Peng, C. Y. S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology* 36 (4-6), 695-711. DOI: 10.1016/s0531-5565(00)00236-9.
- Pain, J. (1966). Note technique : nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles encaptivité. *Ann. Abeille* 9 (1), 71-76.
- Pellati, D., Mylonakis, I., Bertoloni, G., Fiore, C., Andrisani, A., Ambrosini, G. and Armanini, D. (2008). Genital tract infections and infertility. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 140 (1), 3-11. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2008.03.009.
- Peng, Y., Baer-Imhoof, B., Millar, A. H. and Baer, B. (2015). Consequences of *Nosema apis* infection for male honey bees and their fertility. *Sci. Rep.* 5, 10565. DOI: 10.1038/srep10565.
- Pigeault, R., Vezilier, J., Nicot, A., Gandon, S. and Rivero, A. (2015). Transgenerational effect of infection in Plasmodium-infected mosquitoes. *Biol. Lett.* 11 (3), DOI: 10.1098/rsbl.2014.1025.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van der Sluijs, J. P., Van Dyck, H. and Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (1), 68-102. DOI: 10.1007/s11356-014-3471-x.
- Poland, V., Eubel, H., King, M., Solheim, C., Harvey Millar, A. and Baer, B. (2011). Stored sperm differs from ejaculated sperm by proteome alterations associated with energy metabolism in the honeybee *Apis mellifera*. *Mol. Ecol.* 20 (12), 2643-2654. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05029.x.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. and Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.* 25 (6), 345-353. DOI: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- Ratnieks, F. L. W. and Keller, L. (1998). Queen control of egg fertilization in the honey bee. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44 (1), 57-61. DOI: 10.1007/s002650050514.
- Rhodes, J. and Somerville, D. (2003). Introduction and Early Performance of Queen Bees: Some Factors Affecting Success : a Report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, Rural Industries Research and Development Corporation.
- Richard, F. J., Tarpy, D. R. and Grozinger, C. M. (2007). Effects of insemination quantity on Honey Bee queen physiology. *PLoS One* 2 (10), e980. DOI: 10.1371/journal.pone.0000980.

Rinderer, T. E., De Guzman, L. I., Lancaster, V. A., Delatte, G. T. and Stelzer, J. A. (1999). Varroa in the mating yard: I. The effects of Varroa jacobsoni and Apistan (R) on drone honey bees. *Am. Bee J.* 139 (2), 134-139.

Roberts, K. E., Evison, S. E. F., Baer, B. and Hughes, W. O. H. (2015). The cost of promiscuity: sexual transmission of Nosema microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Sci. Rep.* 5, 10982. DOI: 10.1038/srep10982.

Roberts, W. C. and Mackensen, O. (1951). Breeding improved honey bees. *Am. Bee J.* 91, 382-384. DOI.

Roffet-Salque, M., Regert, M., Evershed, R. P., Outram, A. K., Cramp, L. J. E., Decavallas, O., Dunne, J., Gerbault, P., Mileto, S., Mirabaud, S., Pääkkönen, M., Smyth, J., Šoberl, L., Whelton, H. L., Alday-Ruiz, A., Asplund, H., Bartkowiak, M., Bayer-Niemeier, E., Belhouchet, L., Bernardini, F., Budja, M., Cooney, G., Cubas, M., Danaher, E. M., Diniz, M., Domboróczki, L., Fabbri, C., González-Urquijo, J. E., Guilaine, J., Hachi, S., Hartwell, B. N., Hofmann, D., Hohle, I., Ibáñez, J. J., Karul, N., Kherbouche, F., Kiely, J., Kotsakis, K., Lueth, F., Mallory, J. P., Manen, C., Marciniak, A., Maurice-Chabard, B., Mc Gonigle, M. A., Mulazzani, S., Özdoğan, M., Perić, O. S., Perić, S. R., Petrasch, J., Pétrequin, A.-M., Pétrequin, P., Poensgen, U., Joshua Pollard, C., Poplin, F., Radi, G., Stadler, P., Stäuble, H., Tasić, N., Urem-Kotsou, D., Vuković, J. B., Walsh, F., Whittle, A., Wolfram, S., Zapata-Peña, L. and Zoughlami, J. (2015). Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature* 527 (7577), 226-230. DOI: 10.1038/nature15757

Rolland, M., Le Moal, J., Wagner, V., Royere, D. and De Mouzon, J. (2013). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod.* 28 (2), 462-470. DOI: 10.1093/humrep/des415.

Ruttner, F. (1968). L'organe génital mâle et l'accouplement. *Traité de Biologie de l'Abeille*. R. Chauvin. Paris, Masson et Cie, 145-185.

Ruttner, F. (1976). The instrumental insemination of the queen bee. Bucharest, Apimondia.

Ruttner, F. and Koeniger, G. (1971). Filling of spermatheca of honey bee queen - active migration or passive transport of spermatozoa. *Z. Vergl. Physiol.* 72 (4), 411-&. DOI: 10.1007/bf00300712.

Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L. G., Fauser-Misslin, A., Potts, S. G. and Neumann, P. (2014). Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLoS One* 9 (8), e103592. DOI: 10.1371/journal.pone.0103592.

Schluns, H., Koeniger, G., Koeniger, N. and Moritz, R. F. A. (2004). Sperm utilization pattern in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56 (5), 458-463. DOI: 10.1007/s00265-004-0806-5.

Schluns, H., Moritz, R. F. A., Lattorff, H. M. G. and Koeniger, G. (2005). Paternity skew in seven species of honeybees (Hymenoptera : Apidae : Apis). *Apidologie* 36 (2), 201-209. DOI: 10.1051/apido:2005006.

Schluns, H., Moritz, R. F. A., Neumann, P., Kryger, P. and Koeniger, G. (2005). Multiple nuptial flights, sperm transfer and the evolution of extreme polyandry in honeybee queens. *Animal Behaviour* 70, 125-131. DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.11.005.

Schluns, H., Schluns, E. A., van Praagh, J. and Moritz, R. F. A. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* 34 (6), 577-584. DOI: 10.1051/apido:2003051.

Seeley, T. D., Visscher, P. K. and Passino, K. M. (2006). Group decision making in honey bee swarms. *Am. Sci.* 94 (3), 220-229.

Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Ellis, J. D., Rose, R., Tarpy, D. R., Sagili, R. R., Caron, D. M., Delaplane, K. S., Rangel, J., Lee, K., Baylis, K., Wilkes, J. T., Skinner, J. A., Pettis, J. S. and vanEngelsdorp, D. (2016). A national survey of managed honey bee 2014-2015 annual colony losses in the USA. *J. Apic. Res.* 54 (4), 292-304. DOI: 10.1080/00218839.2016.1153294.

Seth, R. K., Kaur, J. J., Rao, D. K. and Reynolds, S. E. (2004). Effects of larval exposure to sublethal concentrations of the ecdysteroid agonists RH-5849 and tebufenozide (RH-5992) on male reproductive physiology in *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.* 50 (6), 505-517. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.03.007.

Shafir, S., Kabanoff, L., Duncan, M. and Oldroyd, B. P. (2009). Honey bee (*Apis mellifera*) sperm competition in vitro - two are no less viable than one. *Apidologie* 40 (5), 556-561. DOI: 10.1051/apido/2009014.

Sharpe, R. M. and Irvine, D. S. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328 (7437), 447-451. DOI: 10.1136/bmj.328.7437.447.

Sharpe, R. M. and Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet (London, England)* 341 (8857), 1392-1395. DOI: 10.1016/0140-6736(93)90953-e.

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J. P., Whitehorn, P. R. and Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22 (1), 5-34. DOI: 10.1007/s11356-014-3470-y.

Slama, R., Hansen, O. K. H., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Giorgis Allemand, L., Eijkemans, M. J. C., Rosetta, L., Thalabard, J. C., Keiding, N. and Bouyer, J. (2012). Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum. reprod. (Oxford, England)* 27 (5), 1489-1498. DOI: 10.1093/humrep/des070.

Slama, R. and Leridon, H. (2014). La fertilité humaine : approches épidémiologique et démographique. La reproduction animale et humaine. M. Saint-Dizier and S. Chastant-Maillard. Versailles cedex, France, Editions Quae, 487-506.

- Steffan-Dewenter, I. and Kuhn, A. (2003). Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proc. Roy. Soc. Lond. B-Biol. Sci* 270 (1515), 569-575. DOI: 10.1098/rspb.2002.2292.
- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., Retschnig, G., Troxler, A., Vidondo, B., Neumann, P. and Williams, G. R. (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *P. Roy. Soc. Lon. B-Bio.* 283 (1835), DOI: 10.1098/rspb.2016.0506.
- Sumpter, J. P. (2002). Endocrine Disruption in the Aquatic Environment. *Endocrine Disruptors – Part II*. M. Metzler. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 271-289.
- Sun, L. W., Jin, R., Peng, Z. H., Zhou, Q. W., Qian, H. F. and Fu, Z. W. (2014). Effects of trilostane and fipronil on the reproductive axis in an early life stage of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology* 23 (6), 1044-1054. DOI: 10.1007/s10646-014-1248-0.
- Sylvester, H. A., Watts, R. P., De Guzman, L. I., Stelzer, J. A. and Rinderer, T. E. (1999). Varroa in the mating yard: II. The effects of Varroa and fluvalinate on drone mating competitiveness. *Am. Bee J.* 139 (3), 225-227. DOI.
- Szabo, T. I. and Heikel, D. T. (1987). Numbers of Spermatozoa in Spermathecae of Queens Aged 0 to 3 Years Reared in Beaverlodge, Alberta. *J. Apic. Res.* 26 (2), 79-82. DOI: 10.1080/00218839.1987.11100741.
- Tarpy, D. R. (2003). Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 270 (1510), 99-103. DOI: 10.1098/rspb.2002.2199.
- Tarpy, D. R., Keller, J. J., Caren, J. R. and Delaney, D. A. (2012). Assessing the Mating 'Health' of Commercial Honey Bee Queens. *J. Econ. Entomol.* 105 (1), 20-25. DOI: 10.1603/ec11276.
- Tarpy, D. R. and Page, R. E. (2002). Sex determination and the evolution of polyandry in honey bees (*Apis mellifera*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 52 (2), 143-150. DOI: 10.1007/s00265-002-0498-7.
- Tassou, K. T. and Schulz, R. (2013). Low field-relevant tebufenozide concentrations affect reproduction in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) in a long-term toxicity test. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20 (6), 3735-3742. DOI: 10.1007/s11356-012-1311-4.
- Tofilski, A. (2014). A scientific note on amoeboid movement of honey bee semen. *Apidologie* 45 (5), 637-640. DOI: 10.1007/s13592-014-0269-2.
- Tofilski, A., Chuda-Mickiewicz, B., Czekońska, K. and Chorbiński, P. (2012). Flow cytometry evidence about sperm competition in honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 43 (1), 63-70. DOI: 10.1007/s13592-011-0089-6.
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M. and Pettis, J. (2008). A survey of Honey Bee colony losses in the US, Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS One* 3 (12), e4071. DOI: 10.1371/journal.pone.0004071.

- vanEngelsdorp, D. and Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80-S95. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.011.
- Verma, L. R. (1978). Biology of honeybee (*Apis mellifera* L) spermatozoa .1. Effect of different diluents on motility and survival. *Apidologie* 9 (3), 167-173. DOI: 10.1051/apido:19780301.
- Verma, L. R. (1978). Biology of honeybee spermatozoa .2. Effect of washing and of sugars on respiration as measured by the cartesian diver technique. *J. Apic. Res.* 17 (4), 176-181. DOI.
- Verma, L. R. (1981). Biology of honeybee spermatozoa .3. Effect of amino-acids and catalase on respiration as measured by the cartesian diver technique. *Apidologie* 12 (4), 377-382. DOI: 10.1051/apido:19810406.
- Verma, L. R. and Shuel, R. W. (1973). Respiratory metabolism of semen of honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 19 (1), 97-103. DOI: 10.1016/0022-1910(73)90225-4.
- Verma, L. R. and Shuel, R. W. (1973). Respiratory metabolism of semen of honeybee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 19 (1), 97-103. DOI: 10.1016/0022-1910(73)90225-4.
- Vidau, C., Brunet, J.-L., Badiou, A. and Belzunces, L. P. (2009). Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol. In Vitro* 23 (4), 589-597. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.01.017
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B., Brunet, J. L., Texier, C., Biron, D. G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L. P. and Delbac, F. (2011). Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *Plos One* 6 (6), DOI: 10.1371/journal.pone.0021550.
- Vidau, C., Gonzalez-Polo, R. A., Niso-Santano, M., Gomez-Sanchez, R., Bravo-San Pedro, J. M., Pizarro-Estrella, E., Blasco, R., Brunet, J. L., Belzunces, L. P. and Fuentes, J. M. (2011). Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Neurotoxicology* 32 (6), 935-943. DOI: 10.1016/j.neuro.2011.04.006.
- Wang, X., Martinez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martinez-Larranaga, M. R., Anadon, A. and Yuan, Z. (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.*, 1-24. DOI: 10.1080/10408444.2016.1223014.
- Wegener, J., Ruhnke, H., Milchreit, K., Kleebaum, K., Franke, M., Mispagel, S., Bischoff, G., Kamp, G. and Bienefeld, K. (2016). Secondary biomarkers of insecticide-induced stress of honey bee colonies and their relevance for overwintering strength. *Ecotox. Environ. Safe.* 132, 379-389. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.06.038.
- Weirich, G. F., Collins, A. M. and Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33 (1), 3-14. DOI: 10.1051/apido:2001001.

- WHO (1992). Technical report series: Recent advances in medically assisted conception, World Health Organisation. 820.
- WHO (2002). Global Assessment of the State-of-the-science of Endocrine Disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2, (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety).
- Williams, B. A. (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell. Microbiol.* 11 (11), 1551-1560. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01362.x.
- Williams, G. R., Troxler, A., Retschnig, G., Roth, K., Yañez, O., Shutler, D., Neumann, P. and Gauthier, L. (2015). Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens. *Sci. Rep.* 5, 14621. DOI: 10.1038/srep14621.
- Wilson, W. T. and Menapace, D. M. (1979). Disappearing disease of honey bees: a survey of the United States. *Am. Bee J.* 119 (3), 184-186.
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honeybee*. Cambridge, MA, USA, Harvard University Press.
- Woyke, J. (1962). Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World* 43 (1), 21-25.
- Woyke, J. (1979). Effect of the access of worker honeybees to the queen on the results of instrumental insemination. *J. Apic. Res.* 18 (2), 136-143.
- Woyke, J. (1983). Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honeybees. *J. Apic. Res.* 22 (3), 150-154.
- Woyke, J. (1984). Ultrastructure of Single and Multiple Diploid Honeybee Spermatozoa. *J. Apic. Res.* 23 (3), 123-135. DOI: 10.1080/00218839.1984.11100621.
- Woyke, J. (1986). Sex Determination. *Bee Genetics and Breeding*. T. E. Rinderer, Academic Press, INC, 91-119.
- Woyke, J. and Jasinski, Z. (1980). Influence of the number of attendant workers on the results of instrumental insemination of honeybee queens kept at room-temperature. *Apidologie* 11 (2), 173-180. DOI: 10.1051/apido:19800207.
- Xiao, D., Yang, T., Desneux, N., Han, P. and Gao, X. (2015). Assessment of Sublethal and Transgenerational Effects of Pirimicarb on the Wheat Aphids *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *PLoS One* 10 (6), e0128936. DOI: 10.1371/journal.pone.0128936.
- Yu, R. L. and Omholt, S. W. (1999). Early developmental processes in the fertilised honeybee (*Apis mellifera*) oocyte. *J. Insect Physiol.* 45 (8), 763-767. DOI: 10.1016/s0022-1910(99)00056-6.
- Yue, C., Schröder, M., Gisder, S. and Genersch, E. (2007). Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.* 88 (8), 2329-2336. DOI: doi:10.1099/vir.0.83101-0.

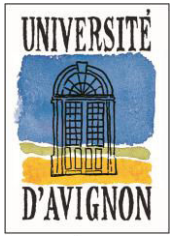
Zareie, R., Eubel, H., Millar, A. H. and Baer, B. (2013). Long-Term Survival of High Quality Sperm: Insights into the Sperm Proteome of the Honeybee *Apis mellifera*. *J. Proteome Res.* 12 (11), 5180-5188. DOI: 10.1021/pr4004773.

Abstract

In a context of honey bee decline, an impoverishment of queen quality, resulting in abnormal brood production and early queen renewal, has been observed worldwide. Hence, the assumption was made that fertility impairment of drones exposed to environmental stressors could explain the queen failure observed in apiaries. In order to test this assumption, original approaches to rear drones were developed in laboratory and semi-field conditions. These approaches enabled to show that the systemic insecticide Fipronil, the pathogen microsporidia *Nosema ceranae* and their combination disrupt drone physiology in different ways, including an impairment of the semen quality. In addition, results have highlighted the high sensitivity of the reproductive function of drone to all of these stress factors. The instrumental insemination of young queens with semen of drones exposed to Fipronil has shown a decrease in the reproductive potential of queens that resulted from a lower number and viability of spermatozoa stored in their spermatheca. Consequently, considering that the spermathecal content determines the egg-laying ability and the lifespan of queens, the risk of queen failure and colony dysfunction is higher. Thus, reproductive disorders, linked to a fertility decline of drones continuously exposed to numerous environmental stressors, could explain, at least in part, the phenomenon of honey bee decline. Thereby, an assessment of the reproductive toxicity of pollutants, including pesticides, to which drones are potentially exposed, should be considered in a future regulatory framework. In this way, the innovative methods and approaches developed in the frame of this work could represent pertinent bases to elaborate new toxicological tests that could be used in the registration procedure of pesticides.

Résumé

Dans un contexte de déclin des colonies d'abeilles mellifères, un appauvrissement de la qualité des reines, se traduisant par une production anormale de couvain et des renouvellements prématurés de reines, a été rapporté par les apiculteurs du monde entier. Partant de ce constat, l'hypothèse avait été émise qu'une atteinte de la fertilité des mâles (faux-bourçons), exposés aux stressseurs environnementaux, pouvait être responsable des défaillances observées chez les reines au sein des ruchers. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des approches novatrices pour élever des faux-bourçons, en conditions contrôlées de laboratoire et en conditions semi-contrôlées, ont été développées. Les approches mises en œuvre ont permis de démontrer que l'insecticide systémique Fipronil, la microsporidie pathogène *Nosema ceranae* et leur association avaient la capacité de générer des perturbations physiologiques de différents types chez les faux-bourçons incluant des altérations de la qualité des semences. De plus, les effets obtenus après les expositions à ces stressseurs ont montré que la fonction de reproduction de ces individus était particulièrement sensible à l'ensemble des stressseurs étudiés. L'insémination instrumentale de jeunes reines, avec des semences de mâles exposés au Fipronil, a mis en lumière une baisse de leur potentiel reproducteur résultant d'une diminution non seulement du nombre mais aussi de la viabilité des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque. Considérant que le contenu de la spermathèque conditionne leur capacité à pondre et leur longévité, ces reines sont donc plus disposées à présenter des signes de défaillance pouvant se répercuter sur le fonctionnement général de leur colonie. Ainsi, les troubles de la reproduction induits par une baisse de la fertilité des mâles, exposés à une multitude de stressseurs environnementaux, pourraient en partie expliquer le déclin des colonies d'abeilles. De ce fait, une évaluation des effets reprotoxiques des substances auxquelles les mâles sont potentiellement exposés, pourrait être envisagée dans un cadre réglementaire à venir. Ainsi, les méthodes et les approches innovantes développées dans le cadre de ce travail pourraient représenter des bases pertinentes pour élaborer de nouveaux tests toxicologiques qui pourraient être utilisés dans la procédure d'enregistrement des pesticides.



UNIVERSITÉ D'AVIGNON
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Ecole Doctorale 536 « Agrosociences et Sciences »

Thèse de Doctorat

Guillaume Kairo

Effets des stressseurs environnementaux sur la reproduction de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) : action par une exposition des mâles

Résumé

Dans un contexte de déclin des colonies d'abeilles mellifères, un appauvrissement de la qualité des reines, se traduisant par une production anormale de couvain et des renouvellements prématurés de reines, a été rapporté par les apiculteurs du monde entier. Partant de ce constat, l'hypothèse avait été émise qu'une atteinte de la fertilité des mâles (faux-bourçons), exposés aux stressseurs environnementaux, pouvait être responsable des défaillances observées chez les reines au sein des ruchers. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des approches novatrices pour élever des faux-bourçons, en conditions contrôlées de laboratoire et en conditions semi-contrôlées, ont été développées. Les approches mises en œuvre ont permis de démontrer que l'insecticide systémique Fipronil, la microsporidie pathogène *Nosema ceranae* et leur association avaient la capacité de générer des perturbations physiologiques de différents types chez les faux-bourçons incluant des altérations de la qualité des semences. De plus, les effets obtenus après les expositions à ces stressseurs ont montré que la fonction de reproduction de ces individus était particulièrement sensible à l'ensemble des stressseurs étudiés. L'insémination instrumentale de jeunes reines, avec des semences de mâles exposés au Fipronil, a mis en lumière une baisse de leur potentiel reproducteur résultant d'une diminution non seulement du nombre mais aussi de la viabilité des spermatozoïdes stockés dans la spermathèque. Considérant que le contenu de la spermathèque conditionne leur capacité à pondre et leur longévité, ces reines sont donc plus disposées à présenter des signes de défaillance pouvant se répercuter sur le fonctionnement général de leur colonie. Ainsi, les troubles de la reproduction induits par une baisse de la fertilité des mâles, exposés à une multitude de stressseurs environnementaux, pourraient en partie expliquer le déclin des colonies d'abeilles. De ce fait, une évaluation des effets reprotoxiques des substances auxquelles les mâles sont potentiellement exposés, pourrait être envisagée dans un cadre réglementaire à venir. Ainsi, les méthodes et les approches innovantes développées dans le cadre de ce travail pourraient représenter des bases pertinentes pour élaborer de nouveaux tests toxicologiques qui pourraient être utilisés dans la procédure d'enregistrement des pesticides.

Mots clés : abeille domestique, faux-bourçon, reine, élevage, pesticides, parasites, synergie, fertilité

Abstract

In a context of honey bee decline, an impoverishment of queen quality, resulting in abnormal brood production and early queen renewal, has been observed worldwide. Hence, the assumption was made that fertility impairment of drones exposed to environmental stressors could explain the queen failure observed in apiaries. In order to test this assumption, original approaches to rear drones were developed in laboratory and semi-field conditions. These approaches enabled to show that the systemic insecticide Fipronil, the pathogen microsporidia *Nosema ceranae* and their combination disrupt drone physiology in different ways, including an impairment of the semen quality. In addition, results have highlighted the high sensitivity of the reproductive function of drone to all of these stress factors. The instrumental insemination of young queens with semen of drones exposed to Fipronil has shown a decrease in the reproductive potential of queens that resulted from a lower number and viability of spermatozoa stored in their spermatheca. Consequently, considering that the spermathecal content determines the egg-laying ability and the lifespan of queens, the risk of queen failure and colony dysfunction is higher. Thus, reproductive disorders, linked to a fertility decline of drones continuously exposed to numerous environmental stressors, could explain, at least in part, the phenomenon of honey bee decline. Thereby, an assessment of the reproductive toxicity of pollutants, including pesticides, to which drones are potentially exposed, should be considered in a future regulatory framework. In this way, the innovative methods and approaches developed in the frame of this work could represent pertinent bases to elaborate new toxicological tests that could be used in the registration procedure of pesticides.

Key words : honey bee, drone, queen, rearing, pesticides, parasites, synergy, fertility