



# PCAA

## Programme canadien d'adaptation agricole



### *Rapport final*

Titre du projet  
Outil de biosurveillance de la prévalence des infections virales dans les colonies d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) dans un contexte agroenvironnemental

6663  
Numéro du projet

Demandeur : Fédération des apiculteurs du Québec (FAQ)

Co-demandeur : Centre de recherche en sciences animales de Deschambault (CRSAD)

Juillet 2012 - Janvier 2014  
Période couverte par le rapport

Rédigé par Mohamed Alburaki et Nicolas Derome, chargé de projet

Date de dépôt du rapport final  
5 février 2014

*Le rapport final, transmis au CDAQ en version papier et Word, doit inclure :*

- les biens livrables décrits à l'annexe C de la convention de contribution financière;*
- les pièces justificatives, numérotées et inscrites dans le document Plan de financement et conciliation des dépenses;*
- les copies des documents de diffusion produits faisant mention de la contribution du PCAA selon les règles de visibilité du programme.*

Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) s'est engagé à travailler avec des partenaires de l'industrie. Les opinions exprimées dans le présent document sont celles du demandeur et ne sont pas nécessairement partagées par AAC et le CDAQ.

## Table des matières

<b><u>1. OBJECTIFS</u></b> .....	4
<b><u>1.1. Objectif général</u></b> .....	4
<b><u>1.2. Objectifs spécifiques</u></b> .....	4
<b><u>2. RESULTATS ET ANALYSE</u></b> .....	4
<b><u>2.1. Résultats obtenus et analyse</u></b> .....	4
2.1.1. Activités réalisées .....	4
2.1.2. Changements à la réalisation du projet .....	5
2.1.3. Résultats obtenus .....	7
2.1.4. Analyse des résultats .....	18
<b><u>2.2. Diffusion des résultats</u></b> .....	22
<b><u>3. CONCLUSIONS</u></b> .....	24
<b><u>4. SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET</u></b> .....	25
<b><u>5. PLAN DE FINANCEMENT ET CONCILIATION DES DEPENSES</u></b> .....	26
<b>6. ANNEXE</b>	

Page 27

Neonicotinoid-coated *Zea mays* seeds affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials, article accepté pour publication

## **1. OBJECTIFS**

---

### **1.1. Objectif général**

L'objectif général est de fournir à l'industrie apicole québécoise un outil de biosurveillance permettant de mesurer l'incidence de l'exposition des colonies d'abeilles à des doses sous-létales de pesticides de la classe des néonicotinoïdes sur leurs performances zootechniques.

### **1.2. Objectifs spécifiques**

- 1) Tester si l'exposition à des doses sous-létales d'un pesticide de la classe des néonicotinoïdes a un effet significatif sur les performances zootechniques des colonies et identifier les périodes d'exposition aiguë aux pesticides (semis, anthèse).
- 2) Tester si l'exposition à des doses sous-létales d'un pesticide de la classe des néonicotinoïdes a un effet significatif sur la prévalence d'infections virales.
- 3) Établir s'il existe des corrélations virus – exposition à un pesticide chez les abeilles en fonction du statut sanitaire des colonies (saines vs malades), en mesurant les niveaux d'expression de gènes viraux, en mesurant précisément les concentrations du pesticide (thiamethoxam) sur le pollen récolté dans les ruches, sur les fleurs de maïs, et sur les abeilles, ainsi qu'en quantifiant les niveaux d'expression d'un biomarqueur de réponse aux néonicotinoïdes sur les abeilles : le gène de l'acétylcholinestérase (neuromédiateur).
- 4) Identifier et quantifier les effets d'interactions synergétiques entre des facteurs de stress biologique (prévalence virale) et chimique (néonicotinoïdes utilisés en enrobage de semence de maïs) sur les performances zootechniques des colonies d'abeilles.

Ces objectifs ont été jugés prioritaires pour la Fédération des Apiculteurs du Québec, la Table Filière Apicole, et l'Union des Syndicats Apicoles du Québec, car ils devraient permettre à l'industrie apicole de définir des seuils de concentration de ces pesticides qui n'auront pas d'incidence négative sur les performances zootechniques des abeilles, garantissant des conditions d'exploitation durable de leur production.

## **2. RESULTATS ET ANALYSE**

---

### **2.1. Résultats obtenus et analyse**

#### **2.1.1 Les activités réalisées**

Les activités réalisées ont été les suivantes :

- A) Évaluation zootechnique des 32 colonies d'abeilles (2012-2013).
- B) Mesure des niveaux d'expression du gène d'AChE des abeilles (2012-2013).

- C) Quantification des niveaux d'infection viraux chez les colonies d'abeilles (2012-2013).
- D) Dépistage du parasite varroa et son niveau d'infestation (2012-2013).
- E) Mesure des concentrations de pesticides (2012-2013).

### **2.1.2. Changements à la réalisation du projet par rapport à ce qui avait été prévu**

La réalité du terrain nous a incités à changer un site pour l'année 2013 :

- Champ #1 = Contrôle #1 inchangé : Au nord du Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD), une série de 6 ruches a été placée au milieu de champs semés avec du maïs non traité.
- Champ #2 = Contrôle #2 changé : du sud du CRSAD, sur le bord du fleuve (à 5 km), vers Donnacona dans un emplacement de champs non traités (7 colonies).
- Champ #3 = Test #1 : Le même que l'année 2012 (St-Marc des carrières), a reçu les mêmes ruches qui ont survécu à l'hiver 2012 (4 colonies). Champs traité
- Champ #4 = Test #2: le deuxième site de maïs traité se situe à Saint-Anne de la Pérade (20 minutes de la Station). Il est facilement accessible par le personnel du CRSAD, (5 colonies).

Quelques modifications ont aussi été apportées au protocole :

#### **A) Évaluation zooteknique des colonies sélectionnées :**

1. **Population d'abeilles et quantité de couvain** : le couvain a été évalué par la mesure de surface du cadre occupée par des larves et en appliquant un taux de 3,9 cellules par cm<sup>2</sup>. Le nombre d'abeilles a été évalué par la méthode comparative de la surface des cadres de la colonie avec des photos de cadres ruche sur lequel le nombre d'abeilles a déjà été compté. Ces mesures ont été réalisées tous les 15 jours durant la période d'activité des abeilles: juin, juillet et août.  
Modification : 1- Nous avons appliqué un test de mesure de surface de couvain beaucoup plus fiable que l'estimation de la surface en cm<sup>2</sup>. Il s'agit d'un comptage par pointage manuel avec l'aide du logiciel Image J. Cette méthode est plus précise mais nécessite beaucoup plus de temps. Nous avons réalisé les mesures tous les 15 jours durant la période d'activité des abeilles ce qui fait au total quatre (4) suivis de couvain sur les 32 colonies pour 2012 et 5 pour 2013.
2. **Production de miel** : la productivité a été évaluée par une mesure du gain en poids de chaque ruche durant la saison apicole. Les colonies complètes sont pesées avec une balance à plateforme ( $\pm 200$  g) toutes les semaines pour 2012 allant du 20 août au 7 Novembre 2012 et tous les 15 jours pour 2013.
3. **Force relative avant et après l'hivernage**: la force de chaque colonie est évaluée en ouvrant chaque ruche et en notant le nombre de cadres occupés par les abeilles en grappe autour du couvain à partir d'une vue du haut de la ruche et également le nombre de cadres à partir d'une vue du bas. L'indice varie entre 0 et 10 et se calcule selon la formule suivante : Force = (nombre de cadres occupés vus du haut + nombre de cadres occupés vus du bas)/2. Modification : 1- cette méthode d'estimation relative de la force des

- colonies a été remplacée par la prolongation des prises de poids (brut et net) hebdomadaires jusqu'au jour de l'hivernage des colonies dans le caveau. 2- Le nombre de cadres avant l'hivernage a été noté. 3- Deux nouvelles pesées durant l'hiver (2012) ont été effectuées pour donner une estimation progressive et exacte de la perte de poids hivernale de chaque colonie.
4. **Deux pesées additionnelles** durant l'hivernage ont été ajoutées au protocole pour 2012. Ces pesées sont prises pendant l'hivernage des abeilles dans un caveau à une température fixe de 5° C. Ces données nous ont permis de documenter une perte progressive de poids pendant l'hivernage, lequel s'étale sur une longue durée de temps allant jusqu'à 6 mois.
  5. **Dépistage de varroa**: étant donné que nos ruches d'expériences ne doivent pas subir de traitement aux pesticides incluant celui contre le parasite *Varroa destructor*, nous avons réalisé la nécessité d'effectuer un dépistage (comptage de chute naturelle) pour cet acararien. Ce comptage s'effectue tous les 15 jours pendant la période d'activité des abeilles, en plaçant un plateau grillagé conçu pour ce dépistage. Cette surveillance de la dynamique du développement du Varroa est primordiale étant donné l'absence du traitement de ce parasite. Un développement rapide du Varroa peut engendrer une perte totale de la colonie. La probable synergie du varroa avec d'autres pathogènes viraux a été étudiée à la fin de chaque année de notre étude.
  6. **Deux nouveaux échantillonnages hivernaux d'abeille adultes** : Pour estimer un éventuel effet cumulatif des pesticides sur les abeilles durant l'hiver (CPE) nous avons décidé l'ajout et l'analyse de l'expression d'AChE de deux échantillonnages d'abeilles d'hiver.
  7. **Etude palynologique du pollen récolté** : compte tenu de l'importance de la détermination des plantes visitées par les abeilles au voisinage immédiat des quatre champs de notre expérience (flore compétitrice du maïs), une étude palynologique détaillée sur le pollen récolté par les abeilles a été effectuée au sein du laboratoire LEGS du CNRS à Paris par Dr. Yves Loublie pour l'année 2012. Pour l'année 2013, cette analyse a été effectuée par Madame Mélissa Girard, du Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD). Cette étude a mis en évidence la flore présente et fréquentée par les abeilles dans les champs ainsi que le pourcentage de préférence manifesté par les abeilles pour chaque fleur accessible (voir Tableau 3).

## **B) Mesure des niveaux d'expression du gène d'AChE des abeilles (2012-2013) :**

La précision dans les résultats attendus de ces analyses nous a conduit à cibler deux tissus différents pour les extractions d'ARN d'abeilles adultes : les cerveaux pour mesurer l'expression du gène d'AChE, et les abdomens pour quantifier la prévalence virale. Ce changement a doublé le temps nécessaire ainsi que les coûts de l'extraction d'ARN. Ces deux différentes extractions s'expliquent par le fait que la présence des virus dans le cerveau de l'abeille est rare et si elle a lieu, est en très faible quantité. Au total, 32X2X4= 256 extractions d'ARN ont été réalisées pour 2012 et 22X2X3= 132 extractions pour 2013.

### **C) Mesures des résidus de plus de 150 pesticides :**

Compte tenu du manque de disponibilité du chimiste de l'Institut des Nutraceutiques et des Aliments Fonctionnels (INAF), Pascal Dubé, nous avons fait appel aux services du chimiste du MAPAQ, Luc Gagnon, spécialisé dans la détection des pesticides pour les échantillons de 2012 et 2013 : fleur de maïs, pollen récolté dans les trappes, abeilles ouvrières et butineuses, et miel. Nous avons aussi envoyé des échantillons de pollen de maïs récolté de nos ruches l'été 2013 à l'équipe du Dr Bonmatin (CNRS, Orléans, France) qui dispose d'appareils de mesure dont les seuils de détection sont 10 fois plus bas (LOD à 0,01 à 0,03 ng/g) que ceux du MAPAQ (LOD à 0,1 ng/g) pour les deux molécules cibles : Clothianidine et Thiamethoxam. Les résultats pour l'année 2012 sont mentionnés dans la publication en annexe et les résultats de 2013 sont indiqués dans le tableau 2. Les analyses effectuées par l'équipe du Dr Bonmatin (CNRS, Orléans, France) sont retardées suite à une panne du matériel de mesure. Nous aurons accès aux résultats à la fin février 2014, soit après le dépôt du présent rapport.

#### **2.1.3. Les résultats obtenus :**

##### **Résultats obtenus de juillet 2012 à mars 2013 :**

Tous les résultats obtenus dans le cadre de ce projet pendant la période mentionnée ci-dessus ont fait l'objet d'une publication acceptée dans la revue PLoS one (voir Annexe). Les résultats de mars 2013 à janvier 2014 sont exposés ci-dessous et feront bientôt l'objet d'une deuxième publication. Toutes les étapes réalisées sur les quatre ruchers expérimentaux du CRSAD sont indiquées par date dans le tableau suivant (tableau 1) :

Tableau 1 : Date et nature des différentes étapes effectuées sur les quatre ruchers expérimentaux pour l'année 2013.

	Rucher 1	Rucher 2	Rucher 3	Rucher 4
Localité géographique	Portneuf	Donncona	St-Marc de s Carrières	Ste-Anne de la Pêraie
Nombre de colonies	6	7	4	5
Dépôt sur champs (2013)	10-avril	10-avril	10-avril	10-avril
Traitement des champs de maïs	Non-traité	Non-traité	Traité	Traité
Nature du traitement	Pas de traitement	Pas de traitement	Enrobage	Enrobage
Pesticide	-	-	Néonicotinoïde (Cruiser)	Néonicotinoïde (Cruiser)
Echantillonnage de semence (2013)	12-mai	12-mai	12-mai	12-mai
Fleuraison du maïs	10-août	10-août	10-août	10-août
Echantillonnage de fleur de maïs (2013)	15-août	15-août	15-août	15-août
Echantillonnage N°1 (50 + 100 butineuses/colonie) (2013)	12-juillet	12-juillet	12-juillet	12-juillet
Echantillonnage N°2 (50 + 100 butineuses/colonie) (2013)	19-août	19-août	19-août	19-août
Echantillonnage N°3 (50 + 100 butineuses/colonie) (2013)	2-septembre	2-septembre	2-septembre	2-septembre
Echantillonnage de pollen N°1 (2013)	28-juillet	28-juillet	28-juillet	28-juillet
Echantillonnage de pollen N°2 (2013)	15-août	15-août	15-août	15-août
Echantillonnage de pollen N°3 (2013)	2-septembre	2-septembre	2-septembre	2-septembre
Etu de du couvain (2013)	29-mai, 13-juin, 4-juillet, 25-juillet, 21-août			
Dépistage de varroa (2013)	31-juillet, 6-août, 15-août, 2-septembre			

## 1. Mortalité de ruches :

La deuxième année de notre expérimentation (2013) a commencé avec 22 ruches d'abeilles distribuées sur quatre sites différents dont deux traités et deux non traités par le pesticide en question (néonicotinoïde – Cruiser de Sygenta). Parmi les 22 ruches, 3 ont péri dans les sites traités et 2 dans les non-traités.

## 2. Analyse de présence de pesticides dans les abeilles, pollen, miel et fleurs de maïs :

Le MAPAQ a effectué une analyse en « Gas Chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry » (GC-MS/MS) pour la détection de 150 pesticides incluant les néonicotinoïdes. Pour minimiser les frais relativement élevés de ce type d'analyse, nous avons groupé des échantillons ensemble sans que cela ait d'influence sur les résultats attendus. M. Gagnon a donc analysé les échantillons suivants :

- 1- 12 échantillons d'abeilles butineuses adultes.
- 2- 12 échantillons de pollen.
- 3- 4 échantillons de semences de maïs.
- 4- 4 échantillons de fleur de maïs, un échantillon de chaque champ.

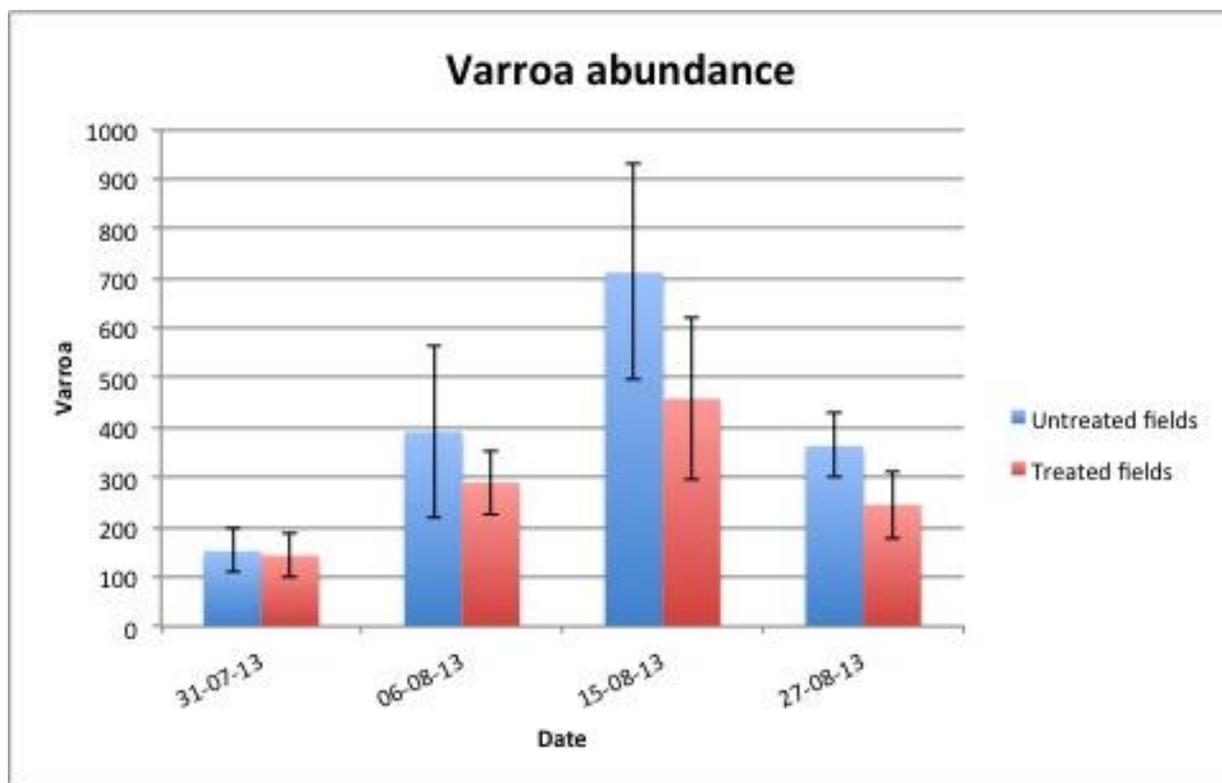
En total, 32 échantillons ont été analysés. Les résultats sont décrits dans le tableau 2.

Tableau 2 : concentration des résidus de pesticides détectés dans le pollen, abeilles butineuses, semences et plantes de maïs pour l'année 2013. (-) signifie non détecté.

	Rucher 1	Rucher 2	Rucher 3	Rucher 4	LD50
Semence de maïs 15-05-13	0,011 mg/kg Thiamethoxam 0,002 mg/kg Clothianidin	0,184 mg/kg Thiamethoxam 0,021 mg/kg Clothianidin	0,005 mg/kg Thiamethoxam 3,178 mg/kg Clothianidin	1,008 mg/kg Thiamethoxam 3,126 mg/kg Clothianidin	0,0037 ug/abeille (0,037 mg/kg)
Fleur de maïs 15-08-13	<0.001 mg/kg Clothianidin	-	<0.001 mg/kg Clothianidin	<0.001 mg/kg Clothianidin	0,0037 ug/abeille (0,037 mg/kg)
Pollen 28-07-13	0.002 mg/kg Phosmet, 0.001 mg/kg Carbendazin	0.11 mg/kg Phosmet, 0.001 mg/kg Carbaryl	0.003 mg/kg Phosmet,	0.001 mg/kg Phosmet, 0.002 mg/kg Boscalid	2 mg/kg Carbaryl
Pollen 15-08-13	0.001 mg/kg Picoxystrobin, Carbendazim, Diuron	0.053 mg/kg Picoxystrobin, 0.019 mg/kg Allethrin	0.003 mg/kg Picoxystrobin, 0.006 mg/kg Allethrin	0.001 mg/kg Phosmet, 0.025 mg/kg Allethrin	4.3 mg/kg Picoxystrobin
Pollen 02-09-13	0.011 mg/kg Phosmet	0.005 mg/kg Picoxystrobin	0.003 mg/kg Picoxystrobin	-	1830 mg/kg Phosmet
Abeille butineuse 12-07-13	-	<0.001 mg/kg Carbendazim, Diuron	<0.001 mg/kg Carbendazim, Diuron	-	1104 mg/kg Diuron
Abeille butineuse 19-08-13	-	0.001 mg/kg Picoxystrobin, Carbendazim, Diuron	0.001 mg/kg Carbendazim, Diuron	-	2000 mg/kg Carbendazim
Abeille butineuse 02-09-13	-	0.001 mg/kg Carbendazim, Diuron	-	-	1104 mg/kg Diuron

### 3. Dépistage du parasite *Varroa destructor*:

La figure 1 résume les résultats de quatre prélèvements de varroas sur les deux groupes de traitements. Il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes, bien que le groupe non traité montre une tendance d'infestation par ce parasite plus élevée. Le taux d'infestation le plus élevé, que ce soit pour le groupe traité ou non, est le 15/08 pour l'année 2013.



*Fig. 1: Différence du niveau d'infestation de varroa entre ruches traitées et non traitées pour quatre dates différentes.*

#### **4- Développement du poids des ruches:**

Cet indice très important a été traité en comparant le poids total des ruches selon deux facteurs principaux (champs traité et non traité). Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 2. Le développement presque identique entre les deux groupes indique que les deux environnements sont comparables. Il n'existe pas de différences statistiques significatives entre les deux groupes étudiés. Le développement des colonies, dans les emplacements traités ou non, manifeste des fluctuations presque identiques, les ruches dans les emplacements traités prennent plus de poids au mois de juin et sont fortement en perte de poids au début de l'automne (Figure 2).



Fig. 2: Le différentiel du développement du poids des ruches traitées et non traitées.

### 5- Étude palynologique :

Les résultats obtenus ont prouvé une présence de grain de maïs *Zea mays* dans les pelotes de pollen récoltées par les abeilles plus importante que l'année précédente. La présence de flores compétitrices comme le trifolium (identifiée durant l'analyse) est sans aucun doute une des raisons les plus probables de déviation des abeilles du maïs. Le tableau suivant (Tableau 3) résume les différents types de pollen identifiés dans un mélange de trois différents prélèvements pour trois différentes dates. Le taux le plus élevé de pollen de maïs identifié dans nos échantillons était de 14,4 % pour la première date de prélèvement de pollen 28-juillet, 4,1 % pour la deuxième date 15-août et 1,1 % pour le 2-septembre (Tableau 1 et 2):

Tableau 3 : Pourcentage de chaque fleur visité par les abeilles dans les pelotes récoltées.

Code pollen	Nom commun	Nom latin	%
<b>P1A</b> Mélange de pollen Récolte du 28-juillet 2013	Trèfle blanc	<i>Trifolium repens</i>	19,5
	Lotier	<i>Lotus corniculatus</i>	18,3
	Crucifère	<i>Brassicaceae</i>	14,0
	<b>Maïs</b>	<b><i>Zea mays</i></b>	<b>14,4</b>
	Salicaire pourpre	<i>Lythrum salicaria</i>	11,3
	Trèfle hybride	<i>Trifolium hybridum</i>	7,0
	Sarrasin	<i>Fagopyrum esculantum</i>	5,8
	Bardane	<i>Arctium sp.</i>	2,7
	Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	1,9
	Mélilot	<i>Melilotus sp.</i>	1,6
	Lupuline	<i>Medicago lupulina</i>	1,6
	Panais sauvage	<i>Pastinaca sativa</i>	0,8
	Verge d'or	<i>Solidago canadensis</i>	0,4
	Baies	<i>Rubus sp.</i>	0,4
	Plantain	<i>Plantago sp.</i>	0,4
<b>P2A</b> Mélange de pollen Récolte du 15-août 2013	Trèfle hybride	<i>Trifolium hybridum</i>	25,7
	Salicaire pourpre	<i>Lythrum salicaria</i>	17,7
	Lotier	<i>Lotus corniculatus</i>	15,3
	Trèfle blanc	<i>Trifolium repens</i>	12,5
	Trèfle rouge	<i>Trifolium pratense</i>	9,5
	Crucifère	<i>Brassicaceae</i>	5,8
	<b>Maïs</b>	<b><i>Zea mays</i></b>	<b>4,1</b>
	Mélilot	<i>Melilotus sp.</i>	3,4
	Verge d'or	<i>Solidago canadensis</i>	2,7
	Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	1,2
	Bardane	<i>Arctium sp.</i>	0,9
	Herbe à poux	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	0,6
	Plantain	<i>Plantago sp.</i>	0,6
<b>P3A</b> Mélange de pollen Récolte du 2-septembre 2013	Trèfle hybride	<i>Trifolium hybridum</i>	25,8
	Trèfle rouge	<i>Trifolium pratense</i>	21,6
	Trèfle blanc	<i>Trifolium repens</i>	13,1
	Verge d'or	<i>Solidago canadensis</i>	11,2
	Type Linaire	<i>Type Linaria vulgaris</i>	10,8
	Crucifère	<i>Brassicaceae</i>	5,2
	Salicaire pourpre	<i>Lythrum salicaria</i>	2,8
	Luzerne	<i>Medicago sativa</i>	1,9
	Baies	<i>Rubus sp.</i>	1,9
	Lotier	<i>Lotus corniculatus</i>	1,4
	Sarrasin	<i>Fagopyrum esculantum</i>	1,4
	<b>Maïs</b>	<b><i>Zea mays</i></b>	<b>1,1</b>

	Eupatoire/aster/verge d'or	<i>Eupatorium/Aster/Solidago sp.</i>	0,9
	Herbe à poux	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	0,5
	Impatiente du Cap	<i>Impatiens capensis</i>	0,5

## 6- Suivre des surfaces de couvain:

Le comptage des surfaces de couvain est réalisé à 80 % pour la deuxième année de notre expérimentation (2013), nous attendons la finalisation du comptage qui est en cours pour traiter statistiquement le jeu de données en entier. Le développement du couvain pour les cinq dates est représenté dans la figure 3, la dernière colonne indique le total des cinq dates étudiées. Il n'existe pas de différences significatives entre les deux groupes, traité et non traité. Cependant, la quantité de couvain est supérieure chez le groupe non traité dès la mi-juin.

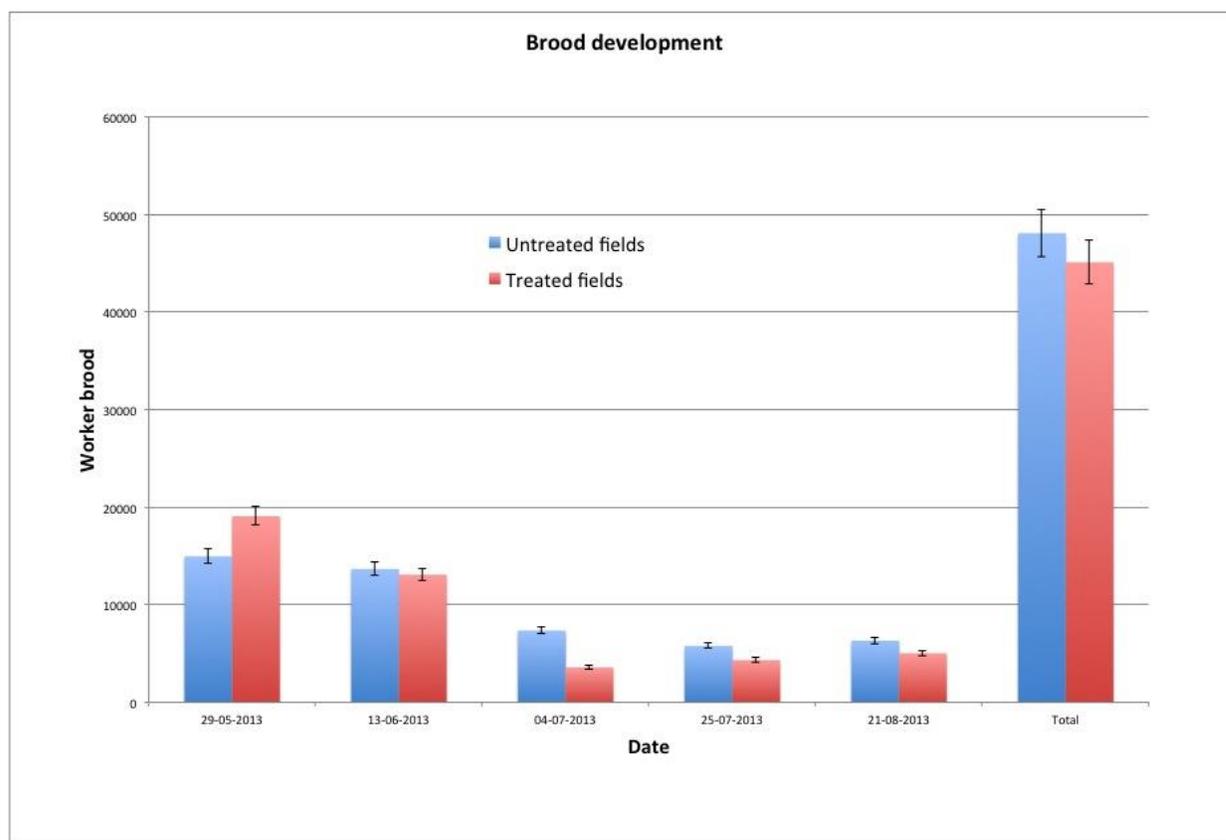


Fig. 3: Représentation du développement du couvain entre ruches traitées et non traitées pour les cinq dates étudiées séparément ainsi que le total des dates.

## 7- Expression du gène AChE:

Plusieurs essais ont été nécessaires afin d'optimiser cette analyse ainsi que celle en relation avec la détection des infections virales chez les abeilles adultes. Les analyses préliminaires nous ont permis de choisir le meilleur gène de référence : le gène GAPDH.

La figure 4 indique un résultat très important, les deux groupes de traitement montrent aucune différence dans leur niveau d'expression de l'AChE pour la première et dernière date, cependant, à la période d'anthèse du maïs (20-08-2013), les colonies d'abeilles situées dans les deux champs traités manifestent un niveau d'expression d'AChE très élevé par rapport à celles dans les non traités. La différence est hautement significative ( $P = 0,0003$ ). Pour être en mesure de tester *in vivo* l'efficacité du gène d'AChE comme étant un biomarqueur de stress résultant d'une contamination aux néonicotinoïdes (Boily et al. 2013), nous devons comparer deux groupes d'abeilles étant sous les mêmes conditions à un même moment donné, ce qui est exactement le cas pour la date 20-8-13 de la figure 4. De façon intéressante, le taux de l'AChE présente un patron d'expression inverse aux deux dates encadrant la période d'anthèse (12-07 et 18-09-2013), même si cette inversion de tendance n'est pas significative statistiquement. Toutefois il est difficile de conclure sur les facteurs impliqués en absence de la certitude qu'il s'agisse de la même génération de butineuses comparée à deux dates consécutives (vie estimée d'une ouvrière en plein saison 2-4 semaines).

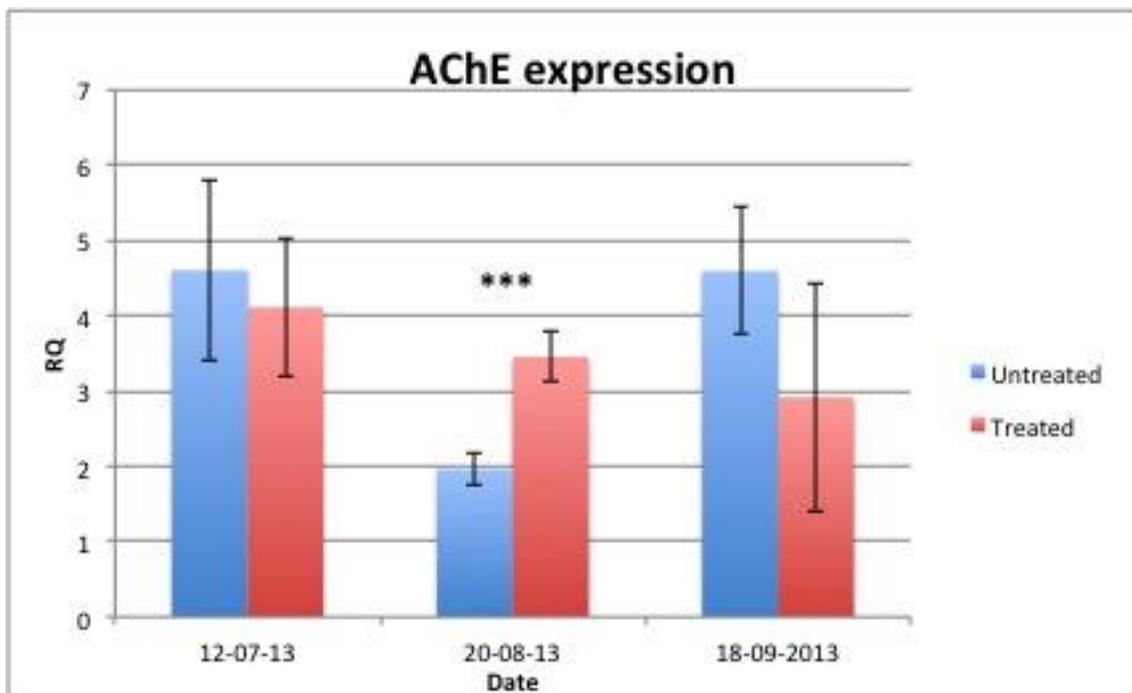


Fig. 4: La moyenne de l'expression du gène d'AChE des ruches traitées et non traitées pour trois dates différentes (avant, pendant et après l'anthèse du maïs).

### Analyse des infections virales:

Les analyses de détection d'infection virales dans les colonies étudiées ont été réalisées. Nous avons optimisé le protocole retenu ainsi que les concentrations d'ARN recommandées pour ce type d'analyse. Le gène de référence utilisé est le RPS18. Comme nous l'avons signalé précédemment, pour être en mesure d'apporter une plus grande précision de l'infection virale, toutes les extractions d'ARN ont été effectuées sur les abdomens des abeilles. Comme l'année précédente, le DWV ne montre aucune différence entre les deux groupes pour trois dates différentes, figure 5.

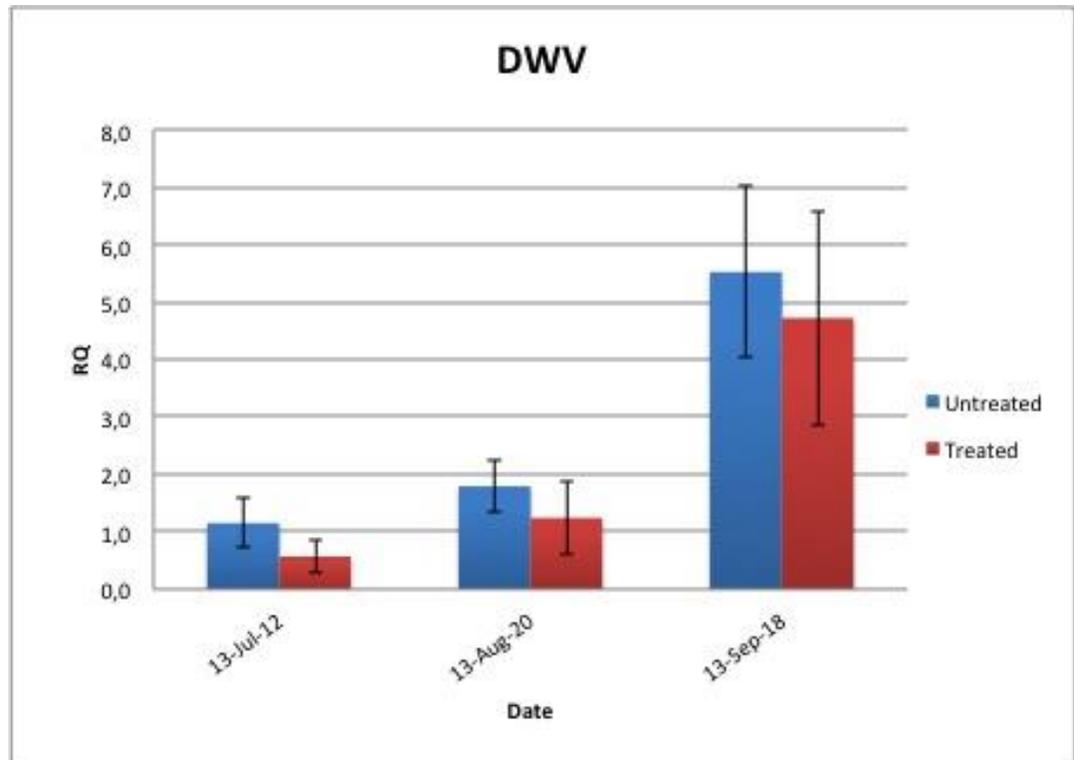


Fig.5: Infection virale par DWV des ruches traitées et non traitées pour trois dates différentes.

Le deuxième virus étudié (BQCV) exprime un niveau d'infection relativement plus élevé dans les ruches non traitées pour la première date seulement. Les deux autres dates n'indiquent aucune différence significative, Figure 6.

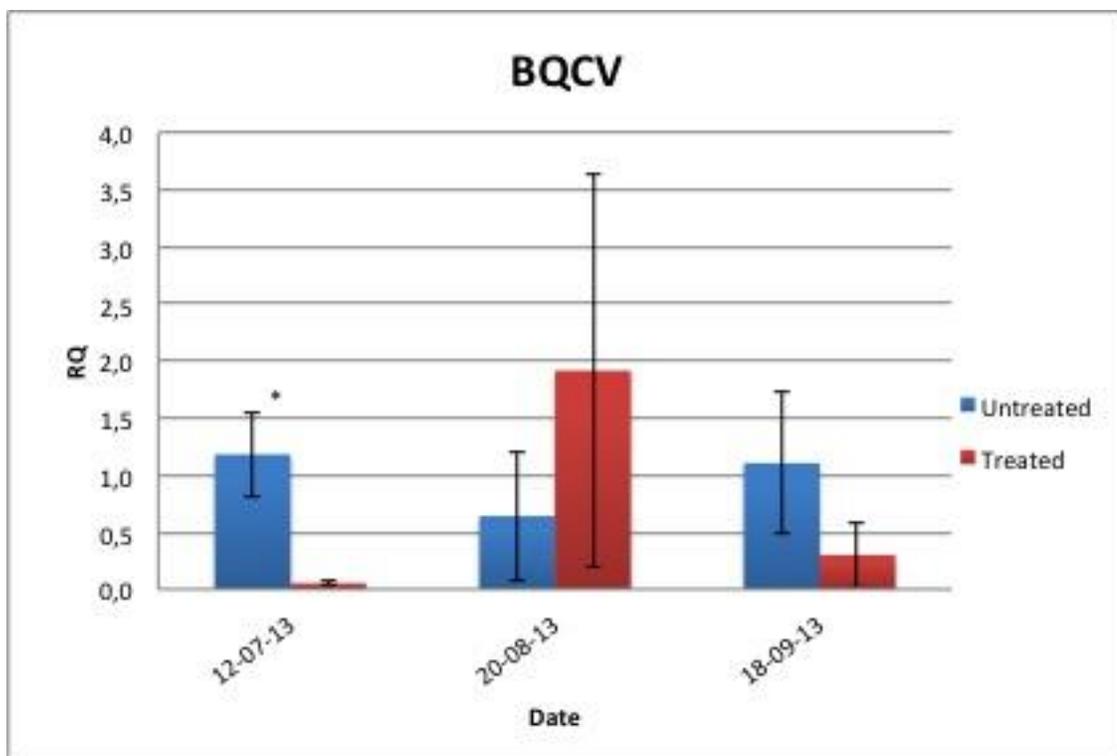


Fig.6: Infection virale par BQCV des ruches traitées et non traitées. (\*) indique une P valeur de 0,05.

Le troisième virus étudié (IAPV) n'a pas été détecté dans nos ruchers expérimentaux pour l'année 2012. En revanche, en 2013, ce virus a été identifié dans plusieurs ruches. Après l'anthèse, les colonies atteintes par ce virus pour 2013 sont situées exclusivement dans les champs traités. Son niveau est considéré significativement plus exprimé dans les ruches traitées que non-traitées ( $P=0,05$ ), Figure 7.

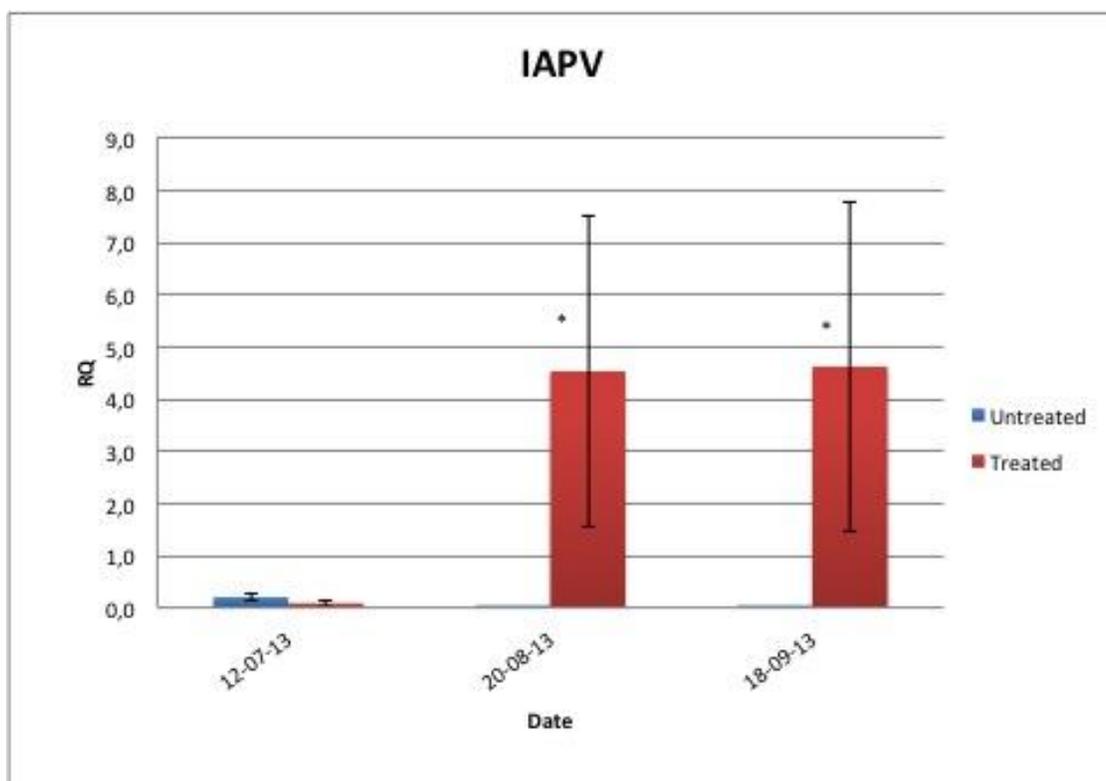


Fig.7: Infection virale par IAPV des ruches traitées et non traitées pour les trois dates étudiées. (\*) indique une P valeur de 0,05.

### Observations importantes durant notre étude :

1. Trois ruches des 32 étudiées ont péri durant la première année d'expérimentation, deux dans un site traité et une dans un site non traité. Cinq ruches sont mortes en 2013, trois dans les sites traités et deux dans les sites non traités. Cela indique une meilleure capacité de survie des ruches dans les champs non traités si nous prenons toutes les données de cette étude en compte, surtout que la perte des deux ruches dans le site non traité n'a pas pu être liée à une maladie en particulier, les symptômes exprimés étaient une dégradation progressive de la population, perte de reine, incapacité de remérage à plusieurs reprises suivie d'une incapacité de fécondation de plusieurs reines vierges (absence de sites de congrégation de mâles fort probablement). Au contraire, la perte de trois colonies dans les sites traités été probablement due à de fortes infections par DWV, dont les symptômes ont été observés sur les butineuses devant les ruches.
2. L'ACHé : la moyenne d'expression de ce gène s'est avérée plus importante dans les sites traités que les non-traités. En 2013, les niveaux d'ACHé indiquent un stress énorme exercé sur les ruches des colonies situées dans les emplacements traités par rapport à celles dans les emplacements non traités. La valeur statistique de cette différence de niveau d'expression est hautement significative ( $P=0,0003$ , Figure 4).

Analyse de pesticides : Pour l'année 2012, la clothianidine a été identifiée sur les fleurs d'un seul champ traité. Cependant, le deuxième champ traité ne montre aucune présence de pesticide bien que la compagnie Syngenta ait confirmé le traitement du champ. La présence de néonicotinoïdes dans le pollen, le miel et les abeilles sur les échantillons prélevés dans les groupes traités était un résultat attendu, mais non obtenu. Le seuil de détection offert par le service de détection chimique du MAPAQ est LOD à 0,1 ng/g pour le thiamethoxam. Or, les doses sous létales de ce pesticide documentées sont cinq à dix fois plus faibles (0,05 ng/g) selon DiPrisco et al. 2013. Il est possible que les concentrations du pesticide (thiamethoxam) sur le pollen récolté dans les ruches étaient inférieures à 0,1 ng/g.

## **2.1.4 Analyse des résultats obtenus pour l'ensemble du projet en fonction des objectifs poursuivis et des résultats attendus**

1) Tester si l'exposition à des doses sous létales d'un pesticide de la classe des néonicotinoïdes a un effet significatif sur les performances zootechniques des colonies et identifier les périodes d'exposition aiguë aux pesticides (semis, anthèse) :

### **a) Poids**

Saison apicole 2012 : Aux mois de septembre et d'octobre, il y a eu une différence significative de poids entre les deux groupes expérimentaux, en faveur des ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes, possiblement en raison d'une source plus abondante de nectar.

Saison apicole 2013 : aucune différence de poids entre les deux groupes expérimentaux (ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes et ruchers contrôle).

### **b) Quantité de couvain**

Saison apicole 2012 : aucune différence de quantité de couvain entre les deux groupes expérimentaux (ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes et ruchers contrôle). (Figure 6b de l'Annexe).

Saison apicole 2013 : Aux mois de juillet et août (3 prélèvements) la quantité du couvain est toujours supérieure chez les colonies des ruchers contrôle (exposés à des semis non traitées). Cette différence n'est toutefois pas significative.

**c) La période d'exposition** aiguë aux pesticides identifiée en 2012 et en 2013 est celle de l'anthèse.

Les semis de maïs ont eu lieu début mai, après la sortie des ruches du caveau (10 avril 2013). Les ruches étant trop faibles (3 cadres) pour un échantillonnage à cette période (faible activité), le premier échantillonnage avant le début de l'anthèse (5 août 2012 et 10 août 2013) a eu lieu le 13 juillet 2012 et le 12 juillet 2013. Pour cet échantillonnage (avant anthèse), les niveaux d'expression de l'acétylcholinestérase mesurés dans les cerveaux des abeilles sont comparables entre les deux groupes expérimentaux (ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes et ruchers contrôle). L'échantillonnage des fleurs de maïs a eu lieu le 9 août 2012 et le 15 août 2013. L'échantillonnage des abeilles correspondant à la période de l'anthèse a eu lieu le 23 août 2012 et le 19 août 2013. Pour les deux années, nous avons

détecté un pic significatif d'expression de l'acétylcholinestérase dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes. Le troisième échantillonnage d'abeille a eu lieu le 02 septembre 2012 et 2013. Il correspond à des niveaux d'expression de l'acétylcholinestérase comparables entre les deux groupes expérimentaux.

2) Tester si l'exposition à des doses sous létales d'un pesticide de la classe des néonicotinoïdes a un effet significatif sur la prévalence d'infections virales :

Oui, ceci a été détecté pour les virus BQCV (2012) et IAPV (2013). Parmi les trois virus testés (BQCV, IAPV, DWV), en 2012, seul BQCV a montré, après l'anthèse, une prévalence significativement plus élevée dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes. Le 23 août 2012, la prévalence du BQCV atteint un pic et est significativement plus élevée dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes. Le 02 octobre 2012, la prévalence du BQCV est encore significativement plus élevée dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes (Figure 4a annexe). IAPV n'a pas été détecté cette année.

En 2013, seul IAPV (non détecté en 2012) a montré, après l'anthèse, une prévalence significativement plus élevée dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes. Le 20 août et le 18 septembre 2013, la prévalence du IAPV est significativement plus élevée dans les ruchers exposés aux champs traités aux néonicotinoïdes (Figure 7).

3) Établir s'il existe des corrélations virus – exposition à un pesticide chez les abeilles en fonction du statut sanitaire des colonies (saines vs malades), en mesurant les niveaux d'expression de gènes viraux, en mesurant précisément les concentrations du pesticide (thiamethoxam) sur le pollen récolté dans les ruches, sur les fleurs de maïs, et sur les abeilles, ainsi qu'en quantifiant les niveaux d'expression d'un biomarqueur de réponse aux néonicotinoïdes sur les abeilles : le gène de l'acétylcholinestérase (neuromédiateur) :

En 2012 nous avons mis en évidence une corrélation significative entre la prévalence de *Varroa destructor*, le virus BQCV et le traitement, à savoir l'exploitation d'un rucher à proximité d'un champ de maïs traité au thiamethoxam. Ce résultat suggère qu'il y a bien une interaction synergétique entre l'exposition à des pesticides et la prévalence de pathogènes et parasites. L'analyse des résultats d'analyse de corrélations pour 2013 est en cours.

Concernant la mesure des concentrations de pesticides, le service d'analyse chimique du MAPAQ a détecté des résidus de clothianidine, qui est un métabolite du thiamethoxam, uniquement sur les fleurs de maïs. Cependant cette molécule n'a pas été détectée dans le pollen récolté dans les ruches, ni sur les abeilles butineuses. Le seuil de détection offert par ce service est LOD à 0,1 ng/g. Or, les doses sous létales de ce pesticide documentées sont cinq à dix fois plus faibles (0,05 ng/g) selon DiPrisco et al. 2013. Il n'a donc pas été possible de mesurer précisément les concentrations du pesticide (thiamethoxam) sur le pollen récolté dans les ruches et sur les abeilles.

4) Identifier et quantifier les effets d'interactions synergétiques entre des facteurs de stress biologique (prévalence virale) et chimique (néonicotinoïdes utilisés en enrobage de semence de maïs) sur les performances zootechniques des colonies d'abeilles :

Étant donné que le service d'analyse chimique du MAPAQ n'a pas été en mesure de détecter des résidus de clothianidine ou de thiamethoxam dans le pollen récolté dans les ruches, ou sur les abeilles butineuses, nous ne pouvons pas conclure définitivement sur une des sources de contamination (butinage pollen de maïs), ni définir des valeurs seuils de concentrations de pesticides dans les fleurs qui n'auront pas d'incidence négative sur les performances zootechniques des colonies d'abeilles.

Néanmoins, les résultats de 2013 suggèrent que des concentrations de 0,184 mg/kg de thiamethoxam dans les plantules de maïs ont une incidence négative sur la santé des colonies d'abeilles qui récolteront une proportion de pollen contaminé supérieure à 4%.

Les résultats de 2012 et 2013 confirment l'efficacité de l'utilisation de l'acétylcholinestérase comme outil de biodétection de l'exposition des abeilles à des cultures traitées aux néonicotinoïdes.

De plus, afin de mettre en évidence le butinage comme source de contamination au thiamethoxam, nous avons envoyé des échantillons de pollen de maïs récolté dans les trappes à l'équipe du Dr Bonmatin (CNRS, Orléans, France) qui dispose d'appareils de mesure dont les seuils de détection sont 10 fois plus bas (LOD à 0,01 à 0,03 ng/g) pour les deux molécules cibles : clothianidine et thiamethoxam. Nous attendons les résultats d'analyse chimique pour apporter une conclusion définitive sur la source de contamination. Les résultats n'arriveront malheureusement qu'après le dépôt du rapport, nous empêchant pour le moment de conclure définitivement sur une des sources de contamination. Ils feront l'objet d'un article scientifique qui sera soumis très prochainement.

En ce qui concerne la définition de valeurs seuils d'activité virale qui n'auront pas d'incidence négative sur les performances zootechniques de la colonie, nous n'avons pas identifié de corrélation significative entre la prévalence virale (BQCV en 2012) et le poids ou la quantité de couvain. Pour 2013, l'établissement d'une corrélation entre IAPV et la quantité de couvain est en cours. De façon intéressante, de faibles valeurs de quantité de couvain mesurées dans les ruchers placés à proximité de champs de maïs traités aux thiamethoxam sont concomitantes avec une prévalence virale significativement plus forte.

**En résumé le projet 6663 a permis de :**

1. Mettre en évidence que l'exposition à des doses sous-létales d'un pesticide de la classe des néonicotinoïdes a un effet synergique significatif sur la prévalence d'infections virales, ainsi que du parasite *Varroa destructor* chez l'abeille mellifère.

2. Mettre en évidence que la période de l'anthèse du maïs correspond au pic d'exposition des colonies d'abeilles exploitées à proximité de champs de maïs traités au Thiamethoxam.
3. Mettre en évidence l'efficacité de l'utilisation de l'acétylcholinestérase comme outil de biodétection de l'exposition des abeilles à des cultures traitées aux néonicotinoïdes.

## 2.2. DIFFUSION DES RÉSULTATS

<i>Activités prévues de l'ANNEXE A</i>	<i>Activités réalisées</i>	<i>Description (thème, titre, endroit, etc.)</i>	<i>Date de réalisation</i>	<i>Nombre de personnes rejointes</i>	<i>Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)</i>
Non prévue initialement	Présentation des résultats obtenus et discussion	Symposium Apimondia 2012, Québec, Qc, Canada Présentation des résultats obtenus (affiche)	Novembre 2012	450	Logo
Non prévue initialement	Présentation des résultats obtenus et discussion	Présentation à l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Université Laval, Québec.	Février 2013	60	Logo
Non prévue initialement	Présentation des résultats obtenus et discussion	Congrès Mondial Apimondia Sept-2013, Kiyv, Ukraine. Présentation orale. <a href="http://apimondia2013.org.ua/en/congress-program/health.html">http://apimondia2013.org.ua/en/congress-program/health.html</a>	Septembre 2013	8000 participants de plus de 100 pays différents	Logo, mention orale
Réunion annuelle du Conseil canadien du miel et de l'Association canadienne des professionnels en apiculture	Non réalisée				
Article scientifique #1	Accepté pour publication à PLoS ONE. (janvier 2014).	PLoS ONE. (janvier 2014)	Janvier 2014	Facteur d'impact : 4,1	Mention.

<i>Activités prévues de l'ANNEXE A</i>	<i>Activités réalisées</i>	<i>Description (thème, titre, endroit, etc.)</i>	<i>Date de réalisation</i>	<i>Nombre de personnes rejointes</i>	<i>Visibilité accordée au PCAA (logo, mention)</i>
Article scientifique #2	En cours de rédaction				Mention
Réunion annuelle de la Fédération des apiculteurs du Québec	Présentation orale des résultats obtenus et discussion	Journée d'information apicole 16 novembre, Victoriaville Présentation invitée.	Novembre 2013	125 part.: apiculteurs, chercheurs, étudiants.	Logo, mention orale

- L'article accepté pour publication dans la revue PLoS ONE (janvier 2014) est en annexe à la fin de ce rapport.  
Une copie des activités où les résultats ont été diffusés (ex. : colloques ou conférences) est transmise par courriel.

### 3. CONCLUSIONS

---

Les résultats de ce projet permettent à l'industrie apicole de connaître :

- 1) des seuils de concentrations du thiamethoxam qui ont une incidence négative sur la santé des colonies d'abeilles ;
- 2) la période du cycle de production du maïs qui est la plus meurtrière pour les colonies d'abeilles exploitées à proximité immédiate de plants issus de semences enrobées au thiamethoxam ;
- 3) l'effet synergétique de l'exposition des abeilles au thiamethoxam sur la prévalence virale et du parasite *Varroa destructor* ;
- 4) l'efficacité de l'acétylcholinestérase comme biomarqueur du stress des abeilles résultant de la présence de cultures de maïs traités au thiamethoxam.

Les principales recommandations découlant des résultats sont :

- Éviter de placer des ruchers d'abeilles à proximité de champs de maïs traités au thiamethoxam, surtout pendant la période de floraison (anthèse) de ce dernier.
- Si le positionnement de ruches d'abeilles à proximité de champs traités s'avère inévitable, il est fortement recommandé de s'assurer de la présence d'une flore compétitrice accessible aux abeilles.
- Le seuil de détection des résidus de pesticides de la classe des néonicotinoïdes (Thiamethoxam, clothianidine) actuellement offert par le laboratoire du MAPAQ est LOD à 0,1 ng/g. Or, les doses sous létales des néonicotinoïdes mesurées *in vitro* sont cinq à dix fois plus faibles (0,05 ng/g) selon DiPrisco et al. 2013. Ces doses sous-létales sont pourtant toxiques pour les abeilles à long terme. Il s'avère donc important que les laboratoires de détection de résidus chimiques du Québec prennent les mesures nécessaires pour atteindre ce seuil de détection de doses sous létales.

- Éléments qui assureront la pérennité du projet (collaboration, mise en œuvre et adoption par le secteur, etc.).

Les résultats de ce projet permettent à l'industrie apicole de définir des seuils de concentration pour le thiamethoxam sur les plantules de maïs qui n'auront pas ou peu d'incidence négative sur les performances zootechniques des abeilles, garantissant des conditions d'exploitation durable de leur production. Les retombées de ce projet sont donc immédiates et auront une incidence majeure sur le long terme, à la fois en maximisant la qualité de la production apicole (miel et services apicoles) et en minimisant ces coûts d'exploitation (moins de perte de ruches ; moins de traitements nécessaires). Comme les virus seront toujours présents chez les abeilles, la meilleure connaissance des conditions qui activent leur expression apportée par le présent projet permettra une gestion plus éclairée des ruchers exposés aux stress agroenvironnementaux qui, eux aussi, demeureront présents dans l'environnement agroalimentaire moderne.

Des analyses complémentaires sont toutefois nécessaires pour définir plus précisément les seuils de toxicité *in vivo* de ce pesticide, car les conditions environnementales varient d'une saison à l'autre. Par exemple, l'humidité dans l'air va influencer sur la fréquentation de la flore compétitrice. De même, des projets de recherche analogues sont nécessaires pour définir les seuils de toxicité *in vivo* d'autres produits phytosanitaires utilisés dans les cultures.

La rentabilité de l'utilisation d'un outil de biosurveillance est démontrée dans plusieurs domaines de l'agriculture, elle permet l'optimisation du rendement de l'industrie dans un contexte de développement durable. La pérennité de cette approche pour l'apiculture est donc plus que tangible.

- Suites possibles au projet :

Un projet de recherche a été soumis au programme Innov'action du MAPAQ pour développer des probiotiques spécifiques de l'abeille pour lutter durablement contre les pathogènes opportunistes (nosérose, virus, loque...) dans des contextes agroenvironnementaux. À partir des échantillons d'abeilles récoltés en 2013, nous analyserons la composition de la flore intestinale afin d'identifier les symbiotes bactériens qui sont affectés par l'exposition aux néonicotinoïdes.

#### **4. SOMMAIRE DES ACCOMPLISSEMENTS DU PROJET**

Ce projet s'inscrit dans le contexte de protection des populations d'abeilles du Québec de l'utilisation excessive de pesticides systémiques dans les grandes cultures de maïs autour du fleuve St-Laurent. Les néonicotinoïdes utilisés en enrobage sur les semences de maïs à proximité des ruchers d'abeilles représentent une source de danger relativement importante pour l'abeille.

Ce projet a été mis en œuvre dans le but comprendre et de mesurer l'impact de l'utilisation des néonicotinoïdes sur la survie et la santé des ruchers d'abeilles présents à proximité des champs de maïs traités par ces pesticides (synergie avec la prévalence virale), afin de tester l'efficacité de biomarqueurs répondant à l'exposition au thiamethoxam (AChE, virus).

Un suivi intensif, durant 16 mois, de 32 ruches d'abeilles, appartenant au rucher expérimental du CRSAD, réparties sur 4 emplacements dont 2 traités et 2 autres non traités par l'insecticide Cruiser (un néonicotinoïde systémique de Syngenta). Les activités réalisées sur ces ruches expérimentales ont été : Suivi des poids des ruches, dépistage de varroa, quantification de trois différents virus infectants les abeilles, suivi du développement des surfaces de couvain des abeilles, analyses chimiques des résidus de pesticides dans le pollen, miel, abeilles butineuses et végétaux de maïs. Ces activités ont été complétées en collaboration étroite entre l'équipe de recherche apicole du CRSAD et l'équipe du Dr Nicolas Derome.

Les résultats de ce projet permettent à l'industrie apicole de définir des seuils de concentrations pour le thiamethoxam sur les plantules de maïs qui n'auront pas ou peu d'incidence négative sur les performances zootechniques des abeilles, garantissant des conditions d'exploitation durable de leur production. Les retombées de ce projet sont donc immédiates et auront une incidence majeure sur le long terme, à la fois en maximisant la qualité de la production apicole (miel et services de pollinisation) et en minimisant ces coûts d'exploitation (moins de perte de ruches ; moins de traitements nécessaires).

Les ruchers d'abeilles déposés à proximité de champs de maïs traités par le néonicotinoïde thiamethoxam subissent un niveau de stress et de pathogènes significativement plus important que ceux présents dans un environnement de culture exempt de néonicotinoïdes. En outre, les résultats obtenus démontrent que les abeilles qui ont récolté ou ont été en contact direct avec le pollen de maïs traité expriment un niveau d'AChE remarquablement plus élevé que celle qui ont récolté le même pollen de maïs mais non traité.

La solution idéale à cette problématique est l'abolition de l'usage des pesticides systémiques de la classe néonicotinoïdes, comme c'est le cas en Europe et/ou, plus concrètement :

- Éviter le positionnement de ruches d'abeilles à proximité de champs de maïs traités, surtout pendant la période de floraison (anthèse) de ce dernier.
- Si le positionnement des ruches à proximité de champs traités s'avère inévitable, il est fortement recommandé de s'assurer de la présence de flore compétitrice accessible aux abeilles. Les mesures des niveaux d'expression du gène de l'ACHÉ ont montré que celui-ci est surexprimé chez les abeilles vivant à proximité de champs de maïs traités par les néonicotinoïdes. De plus, les abeilles vivant à proximité de champs de maïs traités par les néonicotinoïdes ont subi des niveaux de prévalence virale significativement supérieurs lors de la période d'anthèse.
- Il reste à définir précisément les seuils de toxicité des néonicotinoïdes *in vivo* (en champ). Les moyens actuellement disponibles au Québec ne le permettent pas. Le MAPAQ aurait avantage à se doter d'une technologie ayant des seuils de détection plus bas, afin de mesurer précisément les doses de pesticide sur les abeilles ayant butiné sur les cultures traitées.

Le secteur de l'agriculture aurait avantage à adopter des stratégies de lutte durable contre les ennemis des cultures afin de bénéficier pleinement des services de pollinisation des abeilles et autres Insectes.

Dans le but de poursuivre les travaux entrepris, un projet de recherche de trois ans (2014-2017) a été soumis au programme Innov'action du MAPAQ pour développer des probiotiques spécifiques de l'abeille pour lutter durablement contre les pathogènes opportunistes (nosérose, virus, loque...). À partir des échantillons d'abeilles récoltés en 2013, nous analyserons la composition de la flore intestinale afin d'identifier les symbiotes bactériens qui sont affectés par l'exposition aux néonicotinoïdes. Nous isolerons et cultiverons les symbiotes clés, afin de les administrer aux abeilles dont les colonies sont affectées par des infections.

## **5. PLAN DE FINANCEMENT ET CONCILIATION DES DEPENSES**

Le plan de financement (fichier Excel) est joint à ce rapport.

## 6. ANNEXE

### Neonicotinoid-coated *Zea mays* seeds affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials

Mohamed Alburaki <sup>(1,3)</sup>, Sébastien Boutin <sup>(1)</sup>, Pierre-Luc Mercier <sup>(1,3)</sup>, Yves Loublier <sup>(5)</sup>,  
Madeleine Chagnon <sup>(4)</sup>, Nicolas Derome <sup>(1, 2)</sup>

(1) Université Laval, Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS), Québec, Canada

(2) Université Laval, Département de biologie, Faculté des sciences et de génie, Québec, Canada

(3) Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault, Québec, Canada.

(4) Université du Québec à Montréal, Québec, Canada

(5) CNRS, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation LEGS, Gif-sur-Yvette, France.

#### Author's contacts:

Mohamed Alburaki: mohamed.alburaki.1@ulaval.ca

Sébastien Boutin: sebastien.boutin.1@ulaval.ca

Pierre-Luc Mercier: pierre-luc.mercier.1@ulaval.ca

Yves Loublier: yves.loublier@legs.cnrs-gif.fr

Madeleine Chagnon: chagnon.madeleine@uqam.ca

Nicolas Derome: nicolas.derome@bio.ulaval.ca

#### Corresponding Author:

Mohamed Alburaki

Université Laval

Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS)

Pavillon Charles-Eugène Marchand, bureau 1251

1030, Avenue de la Médecine, G1V 0A6, Québec QC, Canada

Phone : +1 (418) 656-2131 poste 6785

Fax : +1 (418) 656-2043

## ABSTRACT

Thirty-two honeybee (*Apis mellifera*) colonies were studied in order to detect and measure potential *in vivo* effects of neonicotinoid pesticides used in cornfields (*Zea mays* spp) on honeybee health. Honeybee colonies were divided and distributed randomly among four different cornfields located near Quebec City, Canada. Two cornfields were treated with a seed-coated systemic neonicotinoid insecticide while the two others were treated with an organic regime and used as control treatments. Hives were extensively monitored for their performance and health traits over a period of two years. Three different honeybee viruses and a biomarker of host physiological stress were investigated using RT-qPCR. The viruses included: 1- Brood Queen Cell Virus (BQCV), 2- Deformed Wing Virus (DWV) and 3- Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV). Brain specific expression variability of the acetylcholinesterase gene (AChE) was used as a biomarker of physiological stress. Gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) was performed to detect pesticide residues in pollen, adult bees and honey collected from the studied hives in each location. In addition, general hive conditions were assessed by colony weight and brood development. Honeybee colonies that foraged in neonicotinoid-treated fields expressed significantly higher AChE levels, showed elevated levels of endo- and ecto-parasitic infection, and reached a lower mean weight at the end of the experiment than those foraging in untreated fields. Furthermore, BQCV infection and varroa infestation correlated significantly with the use of neonicotinoids. Overall, our survey suggests that neonicotinoids exert a synergistic impact on colony survival by promoting both viral pathogen replication and varroa prevalence. These results are congruent with recent *in vitro* observations that neonicotinoids affect honeybee immunity and promote viral prevalence.

**Keywords:** Honeybee, Neonicotinoids, Viruses, Varroa, AChE gene and Pollen.

## INTRODUCTION

Honeybee populations around the world have declined significantly in the last decade [1,2]. The phenomenon of honeybee decline, known as CCD (Colony Collapse Disorder), represents a major challenge for beekeepers and scientists alike. The cause of global honeybee decline is far from clear and is not only attributed to CCD. Only four percent of honeybee winter losses in the United States were due to CCD [3]. Several studies highlight the impact of endemic and emergent pathogens [4-8], others blame the excessive use of pesticides [1,9]. Multiple chemical residues of synthetic origin have been detected inside honeybee hives, including pesticides used in varroa treatment [10,11]. However, no individual factor: environment, pesticide or pathogen seems to act as the principal driver of CCD or other honeybee losses. Thus the massive decline of honeybee populations in the world is widely considered a multifactorial phenomenon [12].

The decline of bee populations has significant implications for plant pollination, including many domesticated crops [13]. Indeed, several authors envisage a looming pollination crisis that threatens worldwide food security [14,15]. The value of crops pollinated by bees was estimated in 2000 at \$14.6 billion US dollars in the United States alone [16]. In the United States, total honeybee colony number has declined by 45% over the past 60 years [17]. The majority of pre-1979 losses were attributed to organochlorine, carbamate and pyrethroid pesticide exposure [18]. In Canada, colony losses seem to be less severe than in the USA although the data is less complete. Wintering losses in 2009-2010 were reported at 23.8% [19] while other studies show a decrease of honeybee mortality in Canada from 35% in 2007 to 15% in 2012 [20].

Over the years, the classes of pesticide used in agriculture and their application methods have shifted substantially. Carbamates, pyrethroids and organochlorides, known for their environmental toxicity and traditionally sprayed directly onto crop plants, have been less used for the favor of new classes of systemic pesticides (neonicotinoids and phenylpyrazoles). Neonicotinoids and phenylpyrazoles, commonly applied as seed-coatings to limit contact with non-target plants and insects, were thought to be less harmful for pollinators. However, various *in vitro* studies have revealed the high toxicity of neonicotinoids such as clothianidin and thiamethoxam to the honeybee [21]. In the field, lethal pesticide toxicity among honeybees has been widely studied across multiple classes of synthetic agent [9,19,22-25]. In such cases, lethal toxicity is easily confirmed via the presence of dead bees in front of the hives. However, fewer studies deal with the effects of sublethal doses of pesticides on honeybees. It is known that the sublethal doses deplete the essential activities of insects [26-29] even at concentrations below the detection limits of analytical chemistry [30]. Sublethal doses significantly decrease honeybee performance and trigger disorders in colony dynamics and labor partition [25,31]. Moreover, it has been proved that honeybee behavior, orientation, communication dances and return flights, especially for foragers, are highly affected by sublethal pesticide doses [32,33]. Sublethal doses of neonicotinoids in particular are known to impair the olfactory memory and learning capacity of honeybees [34-36] and mar the flying behavior and navigational capacity of bee foragers [37,38]. However, currently available analytic chemistry methods, such as liquid chromatography-mass spectrometry techniques, have a detection limit for neonicotinoids ranging from 0.05 to 0.11 µg per gram [39], which is

ten times the sublethal dose that affects *in vitro* bee immune system [40]. Therefore, the in-field assessment of both neonicotinoid sublethal exposure and its consequent toxic effect needs the development of integrative tools which combine more acute chemical detection techniques and validation of highly sensitive physiological biomarkers. Because data concerning insecticide-induced behavioral perturbations is necessarily quantitative in nature, we targeted the efficiency of a quantitative biomarker of neurophysiological stress.

Recent study has linked neonicotinoid sublethal toxicity with an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity in the honeybee [41]. Expressions levels of this neuromodulator thus provide a valuable quantitative proxy. Therefore, expression levels of this new biomarker were targeted in this study together with more classical measures of hive condition, in order to explore the potential effects of neonicotinoid-coated *Zea mays* spp (henceforth ‘corn’) seeds on honeybee health. In order to more faithfully reflect the nature of the *in vivo* neonicotinoid impacts on honeybee health, we examined neonicotinoid toxicity in synergy with three pathogenic viruses known to occur in Canadian honeybee populations, as well as with the parasitic mite *Varroa destructor*. Multiple longitudinal comparisons between colonies were made in the context of natural bee foraging activity and in an experimental system comprising of replicated treated and untreated cornfields in order to isolate the treatment effect. Our results show that honeybee colonies foraging on treated fields demonstrated significantly higher AChE expression, increased viral loads as well as increased varroa infestation during the year of study. However, classic measures of hive condition – mass and brood count – exhibited less disturbance.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Honeybee colonies and locations**

This study was based on 32 managed honeybee colonies, provided by a local beekeeper in Quebec. Colonies were all new healthy divisions of 2012, equal in population size, provided with newly fertilized and tested queens. Honeybees were received on 28-June 2012 in temporary hives. Then they were moved to 32 new Langstroth hives. Colonies were split into four apiaries of 8 colonies each on 1-July 2012. Apiaries were distributed in four different clusters of cornfields southwest of Quebec (Fig.1 and 2). No specific permissions were required to run this study in these locations. Our field studies did not involve endangered or protected species. The GPS coordinates for each location were as following: N° 1 (46°40’31.06” N 71°54’57.98” W), N° 2 (46°38’38.82” N 71°56’56.47” W), N° 3 (46°40’04.80” N 72°00’26.80” W) and N° 4 (46°35’04.48” N 72°14’58.45” W).

Two apiaries (N° 1 and 4) were placed in cornfields that had not been treated with any insecticide, while apiaries (N° 2 and 3) were placed in cornfields treated via seed-coating with a commercial insecticide with thiamethoxam as an active ingredient (Cruiser®, Syngenta, Canada) belonging to the neonicotinoids class (Fig. 2). The four apiary locations are located in a geographical area where climate, environmental conditions and flora are highly similar. Fields (N° 1 and 4) are located in two areas in which pesticides are not allowed. It is not the case for fields (N° 2 and 3) that mainly contain huge cornfields treated with neonicotinoid coated-seeds. To our knowledge, no other chemical pesticides were used on the treated

cornfields such as fungicides or herbicides. We do not exclude the probable use of such pesticides on other cultures in the treated areas. Crop rotations in the four studied areas (N°1, 2, 3 and 4) are most of the time concentrated between Corn *Zea mays* and white Clover *Trifolium* sp.

### **Adult bee and honey sampling**

Fifty adult worker bees per colony were sampled four times; before, during and after corn flowering, as well as one time point during the wintering (Fig. 2). Honeybees were flash frozen in liquid nitrogen for 10 seconds and stored at -80°C for further molecular studies. In addition, 100 worker bees were sampled from each colony in the four time points mentioned above. These honeybee samples were used for pesticide chemical detection. Honey samples were collected from each hive at the end of the corn flowering period. Multiple honey samples were taken from different honey frames of each hive. Honey samples collected from the eight hives of each location were pooled and treated as one sample per apiary in subsequent analyses (Fig. 2).

### **MtDNA analysis**

In order to determine the maternal origin of the studied colonies, a COI-COII mtDNA test [42-45] was performed on worker bees of each colony. Briefly, DNA was extracted from the thorax using the Chelex method [46], standard PCR amplification of the COI-COII intergenic region of the mtDNA was performed followed by an electrophoresis migration on 1.4% agarose gel with the molecular marker MIII (Sigma-Aldrich Biotechnology) and amplified fragment size variation used to determine lineage.

### **RNA extractions**

Total RNA was extracted from honeybee brain and abdomen using TRIzol® Reagent protocol from Invitrogen [47] with some modifications. Briefly, the brains and abdomens of 15 bees from each colony were dissected and added separately to 1 mL Trizol with 5 mg of acid washed glass beads and gently mixed for 2 min. 300 µL of chloroform was added and the total mixture was incubated at room temperature for 15 min followed by a centrifugation at 12000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was then washed with 250 µL each of isopropanol and 1.2 M sodium citrate with incubation for 10 min at room temperature, followed by centrifugation at 12000 rpm for 10 min at 24°C. The pellet was subsequently washed twice with 1 mL 75% ethanol and centrifuged at 12000 rpm for 10 min at 24° C. Finally, the RNA pellet was dried and 30 µL of nuclease-free water was added. RNA was stored at -80°C for further analyses.

### **AChE gene expression and pathogens detection**

One-step reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was used to quantify the expression of the acetylcholinesterase gene (AChE), as well as to evaluate the viral load for

three different virus infections: 1- Black Queen Cell Virus (BQCV), 2- Deformed Wing Virus (DWV) [48] and 3- Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) [49]. Positive and negative controls for each virus were generated from current stocks and run in every RT-qPCR. GAPDH and RPS18 genes were used as reference genes for AChE expression and virus detection respectively in all RT-qPCR. Reference genes were selected after many tests performed based on their accurate results and stability at inter and intra bee tissues [50]. QScript One-Step SYBR Green RT-qPCR kit from Quanta - Bioscience was used to perform all qPCR analyses for both AChE expression and viral detection. The standard protocol of Quanta kit for all the RT-qPCR was applied using 2 µL of 0.1 µg purified RNA.

### **Varroa mite infestation**

Each studied colony had been equipped with a sticky bottom board for varroa mite count. Passive varroa mite counts were made from this board at four time steps for each colony during the period of peak activity (August-September), which coincides with corn flowering. Sticky bottom board counts were used to estimate differences in varroa abundance between colonies located in treated and untreated fields, as well longitudinally across all hives. No chemical treatments for varroa were applied during the experiment.

### **Pollen collection and analysis**

Pollen was collected from four different hives in each of the four apiaries using pollen collectors fixed in the hives' entrances. Pollen was collected at different times: before, during and after the corn flowering period (Fig. 2). Pollen collected from the four different hives in each location were mixed together, desiccated at 37°C for 48h and conserved at -20°C. In order to define the origin and the composition of the collected pollen, a detailed palynological analysis was performed for each pollen sample sampled from each locality and date [51].

### **Pesticide detection**

The presence of 150+ pesticides was evaluated in adult worker bees in this study, as well as in pollen and honey using the gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS) method [52,53]. Threshold detection for neonicotinoids ranges from 0.001 to 0.006 µg/bee [52] and 0.005 µg/bee for thiamethoxam [39]. Analyses were processed at the laboratory of the Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). Pollen samples collected from hives of each apiary were pooled after thorough homogenization. In total, 16 pollen samples were analysed for pesticide residues as well as 12 adult honeybee workers and 4 honey samples. 5 g of each pollen, honeybee workers (50 bees) and honey (2.5-3.0 ml of liquid honey) samples were used for pesticide detection.

### **Hive condition**

Two main parameters were evaluated to measure the biological development of each experimental hive: weight (kg) and the brood area cycle [54,55]. A weekly record was kept of

the hive's weight during summer (March-June), spring (June-September) and fall seasons (September-December) of 2012. During indoor wintering, two measurements were undertaken (15-Jan and 26-Mar, 2013). To evaluate brood development, all bee frames containing capped brood cells were photographed twice per month during the period of activity. Surface area estimations of brood frequency are deemed to be insufficiently accurate, thus capped worker brood cells were counted by manual dotting using Image J software [56]. The total capped worker cells counted for each colony reflects the exact number of eggs laid by the queen in a given time of the brood cycle.

## **Statistical analysis**

All statistical analysis for the AChE gene expression and prevalence of the identified viruses (DWV and BQCV) for all the colonies were performed on sixteen independent biological replicates for each treatment and each date. Those sixteen replicates were technically replicated three times for each RT-qPCR quantification. Statistical analyses concerning colonies that have collected corn pollen were performed on five colonies (two located in treated and three in untreated fields) represented by five biological replicates, which were technically replicated three times for each RT-qPCR quantification.

Each variable (AChE expression, DVW and BQCV prevalence) was tested for normality with the Shapiro-Wilk test. As each variable was not normally distributed, we performed an ANOVA on a generalized linear model (family: quasipoisson) to highlight the effect of two factors; the date and the treatment. Once the effect was significant for the different factor, we performed a comparison of the samples with a Wilcoxon test to assess the robustness of the difference. All statistical analyses were carried out in the R environment [57].

## **RESULTS**

### **Colonies genetic background**

All the studied colonies have shown a (Q) length for their mtDNA COI-COII intergenic region. Thus, they all belong to the North Mediterranean lineage (C).

### **Pollen analysis**

Palynological analyses for each apiary on the four different sampled dates (2, 9, 23-August and 6-September, 2012) (Fig. 2) revealed various types of pollen. *Trifolium* sp. (Fabaceae) was the most visited flower (> 45%) followed by *Lythrum* sp. (Lythraceae) at 12-45%. Several species of *Solidago* (Asteraceae) were also recorded at 3-15%. Corn pollen *Zea mays* (Poaceae) was identified in five hives (R2, R8, R12, R24 and R26) at an abundance of c. 1% of total.

### **AChE expression**

AChE expression levels for all studied samples are summarized in Table 1. The  $\Delta\Delta C_T$  mean was calculated, as well as the relative quantity of original template (RQ), for the colonies located in treated and untreated fields separately. ANOVA P-value shows no significant difference for AChE expressions between colonies located in treated and untreated fields in the four sampled dates, whether the time points were grouped or treated separately (Fig. 3a). However, when comparing AChE levels only for colonies that have collected corn pollen, significantly greater AChE expression ( $P < 0.01$ ) was observed between the colonies located in treated fields than those in untreated ones (Fig. 3b). In both treated and untreated fields, AChE expression levels varied significantly between sampling dates ( $P < 0.001$ ). Finally, the highest AChE expression was recorded during wintertime (15-Jan-13), slightly more expressed in the colonies placed in treated fields (1.14) than those in untreated fields (1.04) but still not statistically significant (Table 1 and Fig. 3a).

### **Virus infection**

RT-qPCR investigations for three viruses (BQCV, DWV and IAPV) revealed no IAPV in analyzed samples. However, BQCV and DWV have been identified at different dates. The highest mean level of BQCV infection was recorded at the end of the corn flowering period (23-Aug-12) for the colonies located in treated fields. Furthermore BQCV infection levels were significantly higher ( $P = 0.002$ ) than in the colonies placed in untreated fields (Table 1, Fig. 4a). DWV demonstrated a different pattern of infection prevalence to BQCV and peaked during winter (15-Jan-13) for both treated and untreated colonies (Fig. 4b). No significant differences between colonies placed in treated and untreated fields were observed for DWV during the summer time (Table 1, Fig. 4b). BQCV decreased gradually in both treated and untreated colonies to reach its lowest levels in winter (15-Jan-13) (Fig. 4a).

### **Varroa mite abundance**

Varroa infestation was higher in hives located in treated fields on all the studied dates (Fig. 5). The highest mean of counted varroa mites was observed in 6-Sep-12 in the colonies of the treated fields with a significant P-value ( $P < 0.01$ ). When infestation data was pooled across all dates, varroa abundance in the colonies located in treated fields was startlingly higher than in those located in untreated fields ( $P$  value  $< 0.001$ ).

### **Chemical analyses**

Detectable pesticide residues on pollen, adult bees, honey and corn flowers for each date are summarized in Table 2. Neonicotinoid pesticides were not detected in honey sampled from the four apiaries in 20-Sep-12. Thiabendazole, a fungicide, was detected in all honey samples at very low concentrations (0.0004-0.0008  $\mu\text{g/g}$ ). Among adult honeybees, no pesticides were detected in any samples at any time points, except for the samples coming from apiary 3 in 13-Jul-12, in which low levels of Atrazine (herbicide) were detected. Very low levels of carbaryl (insecticide) were identified in some pollen samples. However, thiamethoxam (detection limit = 0.005  $\mu\text{g/g}$ ) was not detected. Clothianidin - a neonicotinoid pesticide -

which is a metabolite of thiametoxam was identified in the corn flowers ( $0.0037 \mu\text{g/g}$ ) of the cornfield N° 3 (Table 2 and Fig. 1). This concentration is close to the detection limit.

### **Pesticide-pathogen synergistic effects**

The statistical results show positive correlation between the treatment factor and two pathogens. BQCV infection and varroa infestation correlated significantly with the use of neonicotinoids, ( $P < 0.05$ ).

### **Weight and brood developments**

Experimental hives were weighed weekly from 20-Aug-12 until 5-Apr-13 except during the wintering time in which only two measurements were taken. Differential mean values were calculated for both colony groups: located in treated and untreated fields (Fig. 6a). The total weight development was significantly higher ( $P < 0.01$ ) in the colonies of the treated fields on two dates (17-Sep-12 and 1-Oct-12). Both groups showed equal weights during the wintertime going from 24-Oct-12 until 15-Jan-13. From 26-Mar-13 onwards, the untreated group attained a greater mean weight than the treated group (Fig. 6a). Brood development showed no significant difference between both treated and untreated groups in the four studied dates (Fig. 6b).

## **DISCUSSION**

Over the last 20 years neonicotinoids have emerged as the most widely used class of insecticide. Currently neonicotinoids are permitted in more than 120 countries on more than 1000 different crops [58]. The evidence suggests that most neonicotinoids are highly persistent in water, soil and sediments [59]. Furthermore, neonicotinoids can also accumulate in soil after repeated use [9], which increases their absorption by subsequent cultivated crops or plants in the polluted soils. The study of pesticide toxicity to honeybees in the field presents significant challenges, especially when dealing with sublethal toxicity.

The four apiaries we studied in our experiment are located southwest of Quebec City, in an area dominated by corn cultivation (Fig. 1). In recent years, different levels of honeybee mortality were reported by local beekeepers in the region. In the first year of our experiment, among the 32 studied colonies (16 colonies per treatment, Fig. 2), 2 colonies perished in treated fields while one colony was lost in an untreated field. Although colony death could be related to numerous factors and not only to pesticide use, this remains a key observation. The cause of death differed among the three colonies. Those in the treated fields gradually perished after a remarkable decrease in the number of eggs laid by the queen, and symptoms of deformed wings were also recorded (data not shown). Conversely, the colony of the untreated field did not exhibit any disease symptoms, but died because of its incapacity to replace its queen at the very beginning of the experiment.

Comparisons of AChE activity over all colonies revealed no significant differences between honeybee colonies located in treated and untreated cornfields (Fig. 3a, Table 1). However,

palynological analysis undertaken from the collected pollen revealed that among the thirty-two studied colonies, only five colonies had collected corn pollen (R2, R8, R26: untreated fields and R12, R24: treated fields). Although that corn pollen was at lower concentration (1%) when compared to another recent study (ranging from 2.6 % to 82.7 %) [60], AChE expression was significantly higher in foragers from hives placed near the two replicated treated fields (Fig 3b). This result shows that AChE gene expression provides a relatively efficient biomarker to detect neurophysiological stress, which in our case, is significantly associated with corn pollen collected in two independent cornfields treated with thiamethoxam. AChE expression is well linked to the neonicotinoids' toxicity in honeybees [41]. However, to the best of our knowledge, no evidence was provided linking AChE with other agrochemicals. Thus, we suggest that significantly elevated AChE expression in the colonies located in the two treated cornfields - which occurred concomitantly with the flowering period (July and August), declining in Oct-2012 (Fig. 3b) - is very likely to have a causal link to the presence of sublethal doses of thiamethoxam insecticide.

Among the three studied viruses, BQCV and DWV were identified at various levels in several hives. IAPV, on the other hand, was absent. Infection with BQCV was significantly higher in the hives located in treated fields, especially during the corn flowering period (Fig 4a). Elevated BQCV levels among treated colonies correlated significantly to high varroa mite prevalence. The varroa mite is a known vector of BQCV virus and other pathogens found in honeybees [61-64]. Furthermore, we detected a significant interaction between both pathogens and the proximity of the honeybee colonies with two cornfields treated with the thiamethoxam neonicotinoid. Taken together, our study suggests that in field exposure of honeybee colonies to neonicotinoids might promote both viral pathogen replication and varroa prevalence. The neonicotinoid triggering of viral pathogen replication was demonstrated to occur *in vitro* at sublethal doses [40]. Moreover, sublethal doses of neonicotinoid negatively impacted honeybee immunity. Taken together, it is likely that these molecules, although at undetectable levels, have lowered the capacity of honeybees from hives located near treated fields to control the studied pathogens. Chemical agents that promote honeybee susceptibility to pathogens have been demonstrated previously, notably in a link between microsporidia (*Nosema* sp) infection and neonicotinoid pesticides [65]. Furthermore in our study, genetic background - which could play a confounding role - can be largely discounted given that all bees shared similar ancestry (Lineage C) and hives were randomly assigned between treatments.

Unlike BQCV, DWV infection showed no significant difference between colonies located in treated and untreated fields even among hives where corn pollen was detected. Notably however, DWV infection among all hives increased dramatically during indoor wintering (Fig. 4b). Indoor wintering is a common practice throughout much of the northerly distribution of apiculture. In Canada, overwintering losses in 2012 accounted for 15% of the total number of hives [20]. Elevated viral transmission between physically concentrated and improperly isolated hives may contribute significantly to observed losses and urgently needs to be taken into account by beekeepers and policy makers alike.

Longitudinal measurement of colony weight gain (kg) revealed significant differences among hives located in the treated fields from end of August to early October 2012 (Fig. 6a). Thus hives in the treated fields behaved marginally better in terms of weight gain (pollen and nectar collection, foraging) from 27-Aug-12 to 24-Oct-12 (significant differences were observed in the 17-Sep-12 and 1-Oct-12 period). On 31-Oct-12, both treatments groups were almost equal in weight. Measurements are ongoing and at the time of writing indicate better weight development of the hives in untreated fields right after the end of the 2012 wintering (26-Mar-13) (Fig. 6a). Therefore, significant weight differences in the colonies of the treated fields are unlikely to result from pesticide treatment. Instead they are more likely to represent random effects between the four apiary locations as well the random assignment of hives to treatments at time zero. As such, the initial mean weight of the colonies located in the treated fields was 1% higher than those placed in the untreated fields (20-Aug-12).

In comparison to overall mass, brood measurements (Fig. 6b) varied little between treatments. Interestingly, the decline in brood that we observed over all the hives on 13-Sep-12 were not accompanied by a decline in overall mass. Indeed overall mass increased in this period and suggests gains represented by honey and pollen collections, not colony size. Whatever the nature of these gains, it seems that neonicotinoid exposure had little impact on honeybee brood at the timescales addressed in our study. This result is similar to the data obtained on honeybees foraging in corn and canola fields treated with clothianidin [66].

Finally, thiamethoxam molecules were undetectable, even in the corn flower samples taken from treated plants (Table 2). Interestingly clothianidin, which is a metabolite of thiamethoxam, was detected at 0.0037  $\mu\text{g/g}$  in flowers taken from treated plants (Table 2). Because this concentration is close to the theoretical detection limit (0.005  $\mu\text{g/g}$ ) [39], this result must be interpreted cautiously.

## CONCLUSIONS

Our data shows that honeybee colonies placed in fields planted with neonicotinoid coated seeds experienced significantly higher varroa mite loads, and higher BQCV prevalence than colonies which were placed in control corn fields. Moreover, for colonies that had collected corn pollen, AChE levels were significantly higher in honeybees that were physically in contact with corn flower pollen from neonicotinoid-treated fields. Whether AChE increases, as recorded in our study, are only due to the treatment factor or not, it has been previously *in vitro* confirmed that sublethal doses of neonicotinoids induced such AChE augmentations on honeybee [41]. As expected, chemical analyses failed to detect thiamethoxam in any samples.

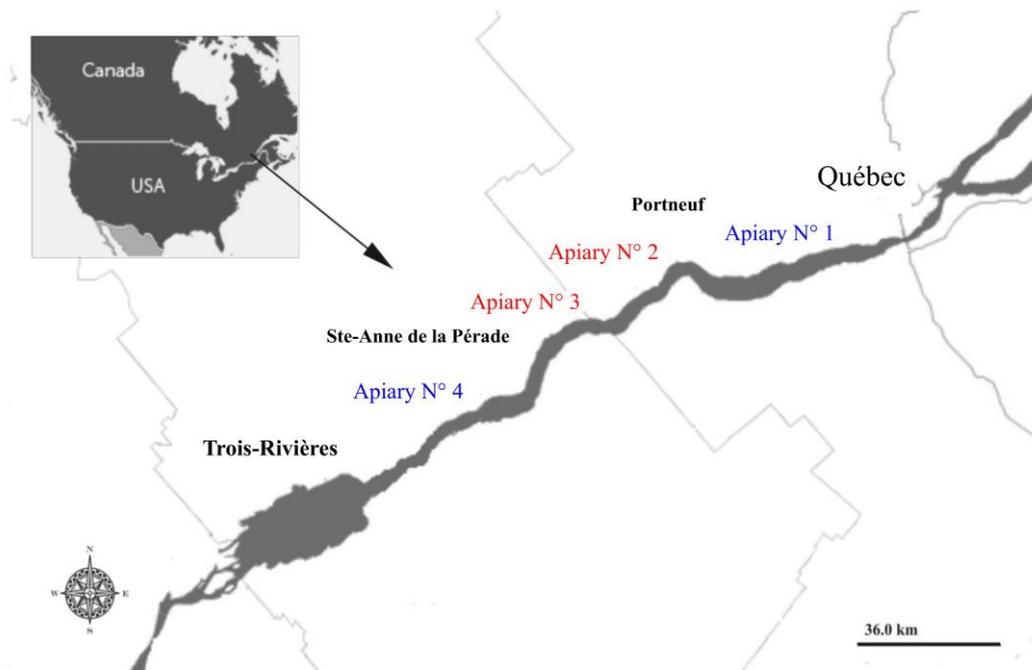
As stated in the introduction, currently available methods (GC-MS/MS) have detection thresholds for neonicotinoids ranging from 0.05 to 0.07  $\mu\text{g/g}$  [39], which are suitable for detecting lethal concentrations of neonicotinoid such as thiamethoxam (LD 50 at 0.05  $\mu\text{g/g}$ ), and clothianidin (LD 50 at 0.038  $\mu\text{g/g}$ ) [67]. However, they are unsuitable for detecting sublethal concentrations as *in vitro* toxicity was observed at concentrations below 0.013  $\mu\text{g/g}$  for clothianidin [40].

Therefore more accurate methods detecting sublethal doses of pesticide, such as polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay [68], are strongly needed to provide rapid, efficient and cost effective tools for in-field monitoring. Nevertheless, higher endo- and ecto- parasitic abundance was recorded from replicated honeybee colony groups foraging in two independent treated cornfields with thiamethoxam. Furthermore, the significant synergy between thiamethoxam, varroa mite infestation and BQCV as evidenced in the present work is entirely consistent with scenarios proposed to underline honeybee losses as a multifactorial symptom. Such observations may result from both an alteration of the bees' hygienic system and immune response [69,70].

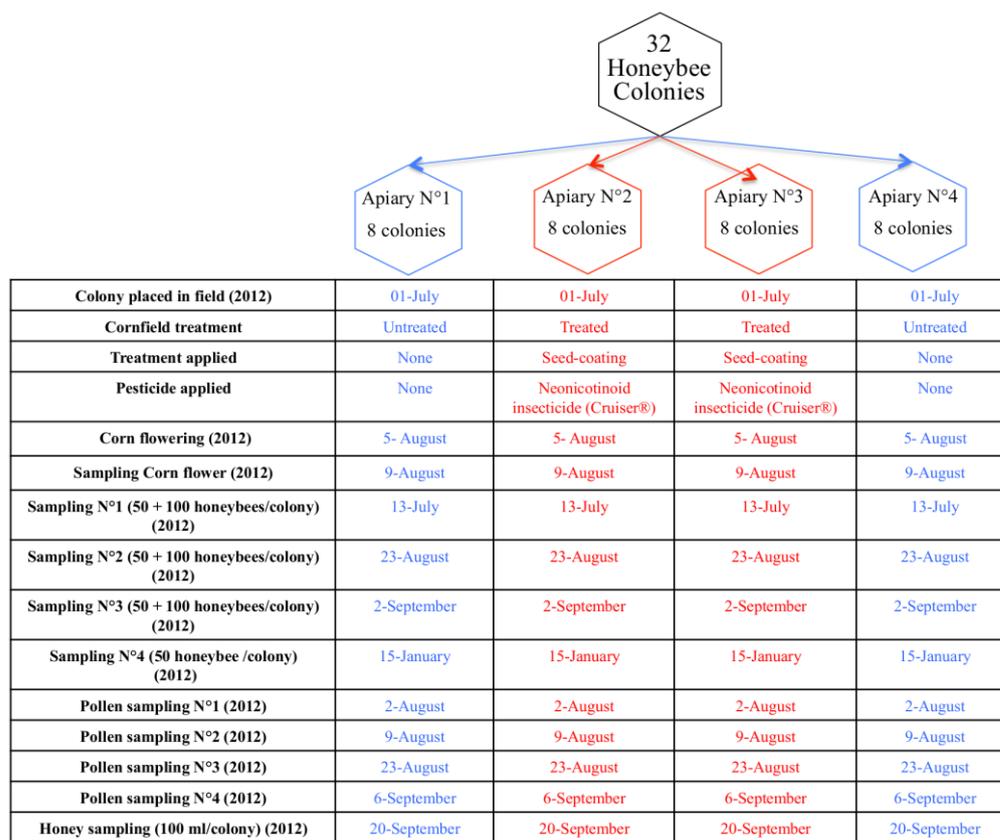
## **ACKNOWLEDGMENT**

We are grateful to the Conseil pour le Développement de l'Agriculture du Québec (CDAQ) who have financed this study via the PCAA grant program, as well as to the Centre de Recherche en Sciences Animales de Deschambault (CRSAD) for its invaluable logistical support on the field and the Fédération des Apiculteurs du Québec (FAQ) which supported the project. The authors would like to warmly thank Aysha Rahman for her contribution in brood counting. We are also grateful to Dr. Martin Llewellyn and Dr. Aziza Rahman for reviewing this manuscript and providing valuable comments.

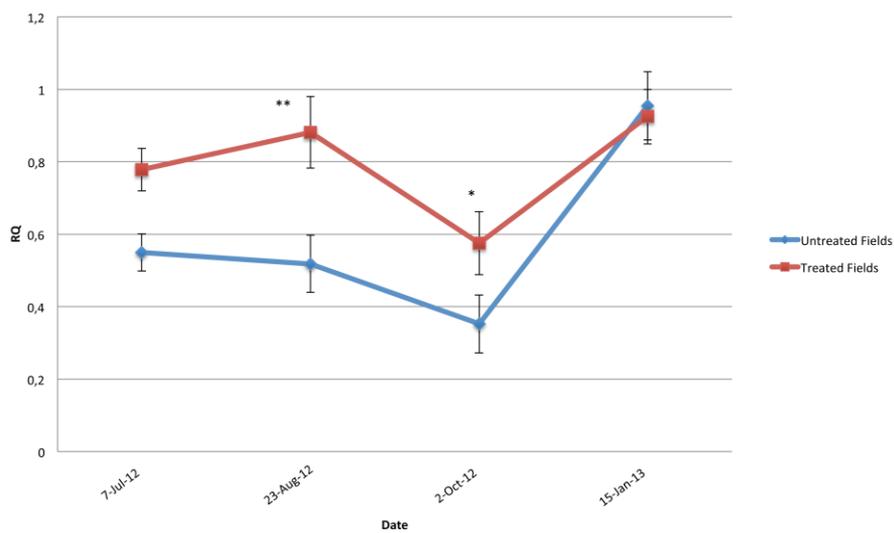
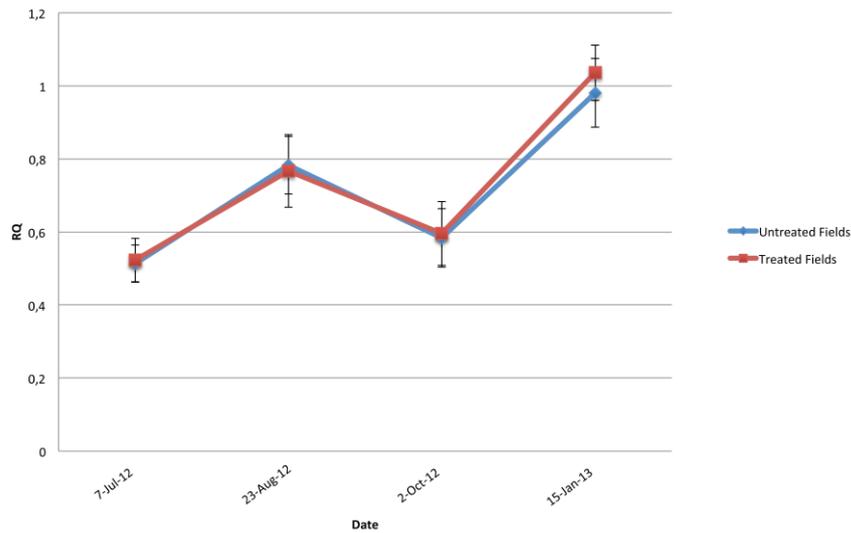
**Fig. 1** Location of the four honeybee apiaries southwest of Quebec City. Each apiary consisted of eight honeybee hives. Apiaries 1 and 4 are located in untreated cornfields while 2 and 4 are in fields sown with neonicotinoid treated seeds.



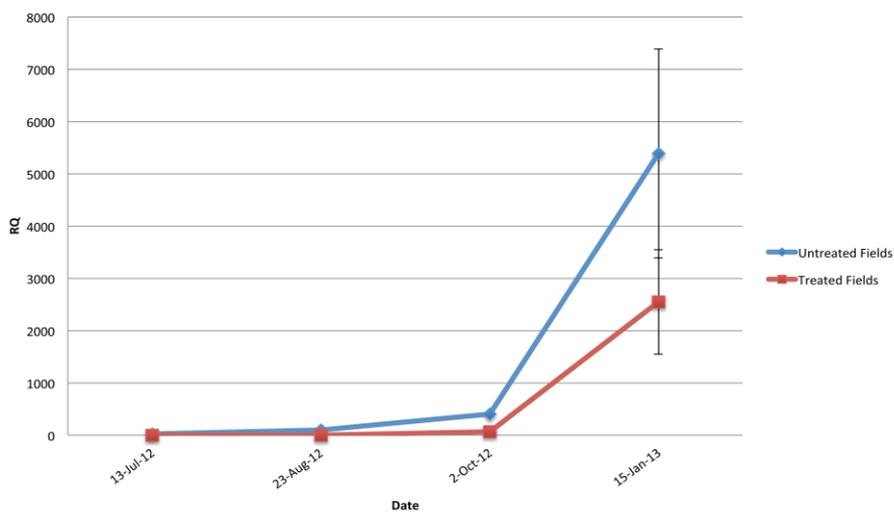
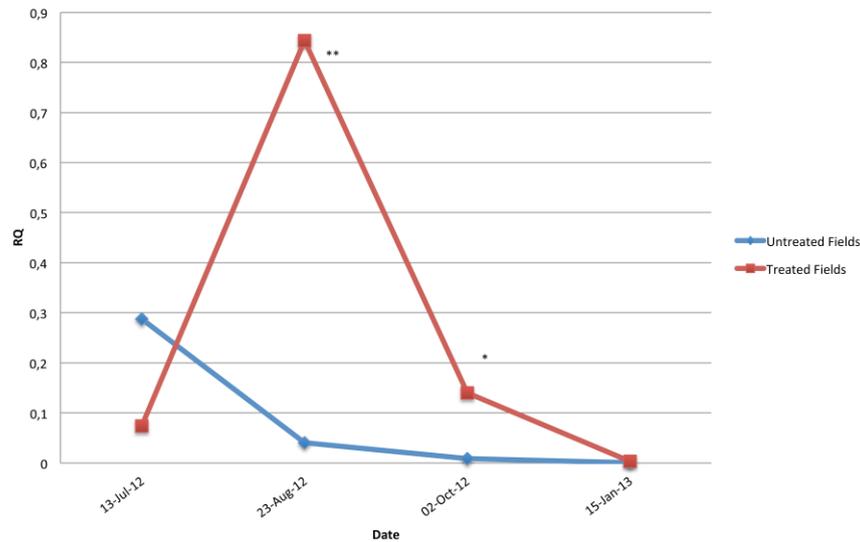
**Fig. 2** Timetable of the various procedures undertaken in this study. Sampling dates for all samples (honeybee, pollen and honey) are mentioned as well as the pesticide used in each field.



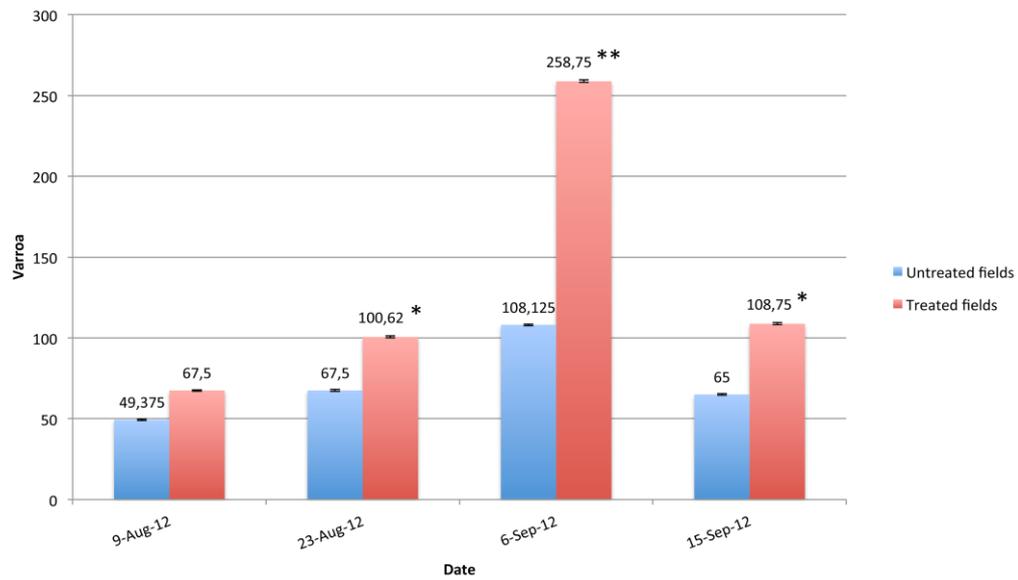
**Fig. 3 a)** Means of AChE expression on four dates for all studied hives, located in treated and untreated fields **b)** Means of AChE expression on four dates for the colonies that have collected corn pollen: (R12 and R24) in treated fields and (R2, R8 and R26) in untreated fields. P values are \* P<0.05, \*\* P<0.01.



**Fig. 4** Mean level of **a)** Black Queen Cell Virus (BQCV), **b)** Deformed Wing Virus (DWV) infections for the 32 studied colonies, 16 colonies in each treated and untreated fields on four different dates. RQ is the relative quantity of the virus infection in the original samples. P values are \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .



**Fig. 5** Varroa mite abundance in the 32 studied colonies, 16 colonies in each treated and untreated cornfields on four different dates. P values are \* P<0.05, \*\* P<0.01.



**Fig. 6 a)** Differential weight of the hives mean weight values in treated and untreated fields **b)** Worker brood mean values for the 32 studied colonies, divided in two groups (16 colonies in each treated and untreated fields), (\*\*) means  $P < 0.01$ .

