

# Etude en laboratoire des effets de la co-exposition d'abeilles émergentes au CBPV et au thiaméthoxam

---

Ce chapitre décrit les travaux effectués au laboratoire de l'Anses de Sophia Antipolis sur les interactions CBPV / thiaméthoxam *in vitro*.

Dans un premier temps, des expériences préliminaires ont été nécessaires. En effet, il n'existait pas à notre connaissance de données spécifiques concernant la métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine par les abeilles exposées de façon chronique, ni de méthode expérimentale de transmission du CBPV autre qu'une injection. Les questions de recherches précédemment citées auxquelles j'ai cherché à répondre dans ce premier chapitre sont les suivantes :

- Est-il possible de se passer d'injection pour transmettre et étudier l'infection des abeilles par le CBPV, dans des conditions les plus proches possibles des infections naturelles ?
- Quel est le devenir du thiaméthoxam et de son métabolite la clothianidine dans les abeilles exposées chroniquement à des doses sublétales ?
- Quels sont les effets d'une co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam de façon chronique ?
  - Sur la mortalité des abeilles ?
  - Sur les charges virales du CBPV ?
  - Sur la consommation en sirop ?
- Les effets observés peuvent-ils être expliqués par un effet de l'un, de l'autre ou de l'interaction entre ces facteurs sur l'expression de gènes de l'immunité ou de la détoxification ?

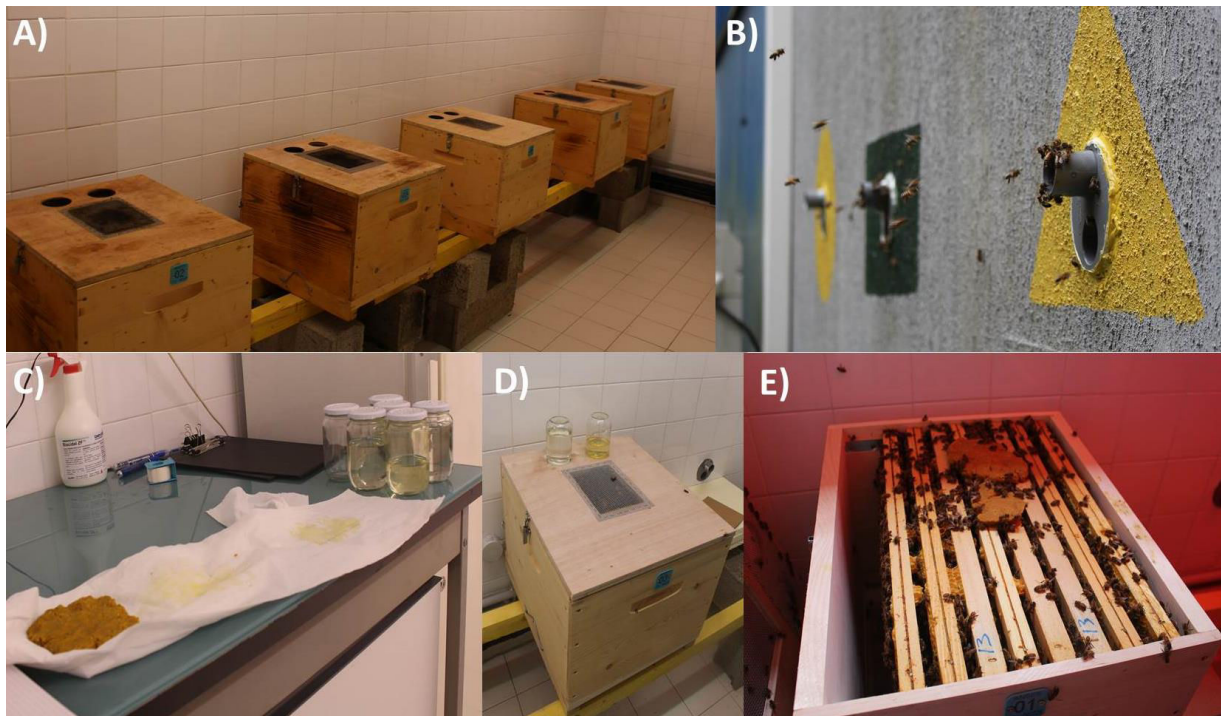


Figure 21 : Le rucher hivernal utilisé pour fournir les abeilles d'une partie des expérimentations effectuées au laboratoire de l'Anses de Sophia-Antipolis (expériences effectuées de Janvier à Mars).

A) organisation des ruches à l'intérieur (température constante gardée autour de 20°C) ; B) accès à l'extérieur pour les vols d'hygiène et élimination des abeilles mortes, début de butinage au printemps ; C) préparation de la nourriture : à gauche, pâte protéinée (décrite dans ce chapitre) à droite eau et sirop de saccharose 50 % ; D) ruche fermée avec nourrisseurs ; E) ruche ouverte avec la pâte protéinée placée sur les cadres ; l'ouverture des ruches se fait en lumière rouge, invisible pour les abeilles, afin qu'elles restent le plus calmes possible (photographie : ANSES - Nicolas Cougoule).

Ainsi, pour minimiser l'impact dû à l'injection du virus, et pour se rapprocher au maximum de ce qu'il pourrait se passer au sein d'une colonie dans les conditions naturelles, j'ai tout d'abord développé une méthode de **transmission du CBPV** par contact entre abeilles.

Puis, pour connaître le devenir de mon pesticide modèle dans l'abeille, j'ai suivi la **cinétique de métabolisation du thiaméthoxam** dans des abeilles en exposition chronique.

J'ai ensuite utilisé la méthode de transmission obtenue ainsi que les nouvelles connaissances obtenues sur la cinétique du thiaméthoxam pour développer et effectuer une première expérience de co-exposition chronique au thiaméthoxam et CBPV chez des abeilles en cage, mesurant les effets de la co-exposition sur la survie des abeilles, leurs charges virales en CBPV, certaines réponses métaboliques, ainsi que la métabolisation du thiaméthoxam. Les résultats obtenus lors de ces expériences seront présentés sous la forme d'un premier article, soumis au journal *Pesticide Biochemistry and Physiology* le 12/04/2017.

Enfin, pour approfondir les résultats obtenus dans ce premier article et découvrir l'origine des interactions observées sur les mortalités et charges virales des abeilles testées, j'ai reproduit l'expérience en étudiant la transcription de gènes de l'immunité et de la détoxification. Les résultats obtenus seront présentés sous la forme d'un second article.

## Transmission CBPV

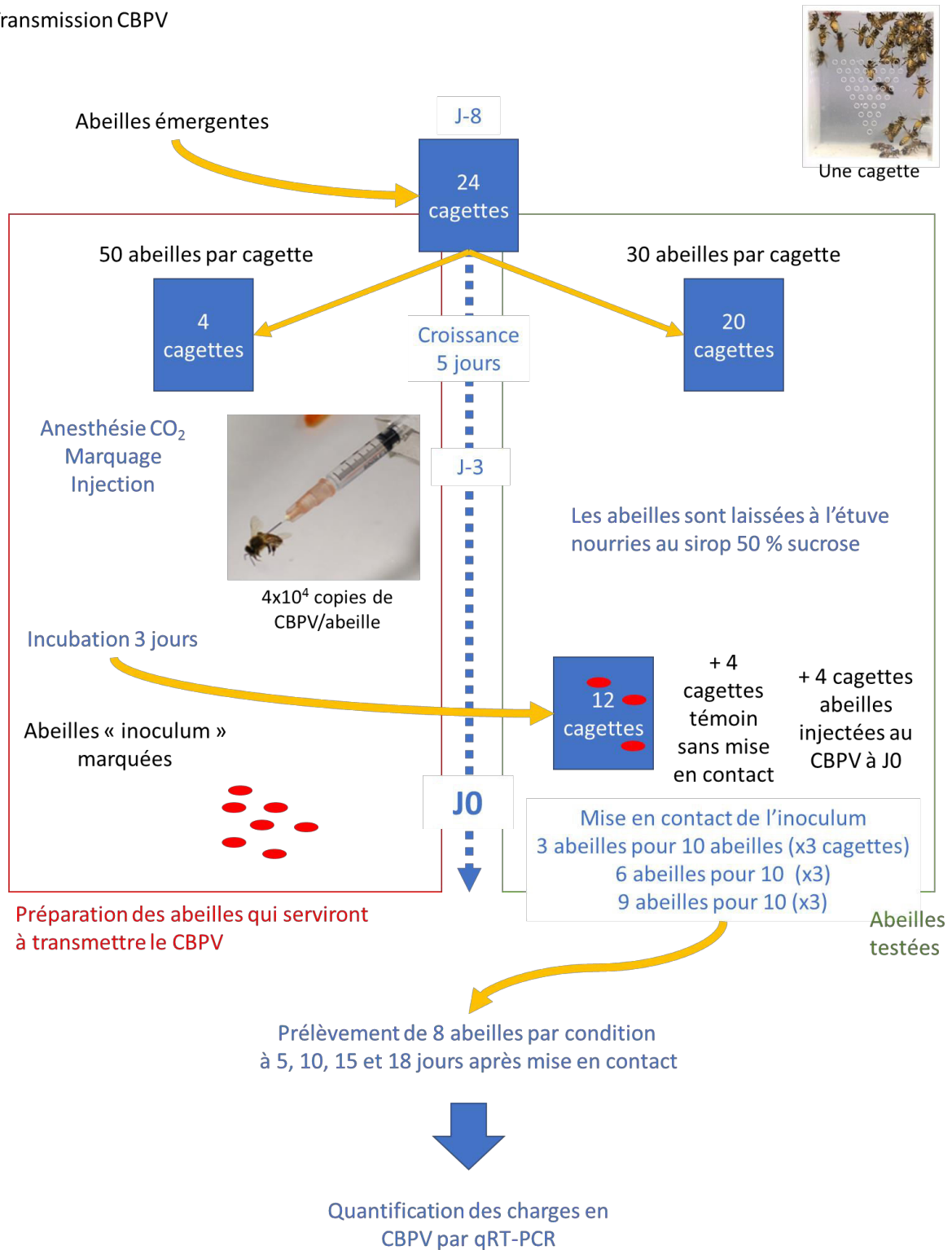


Figure 22 : Schéma récapitulant la méthode de transmission du CBPV par contact entre abeilles infectées et abeilles saines développée et utilisée dans ce chapitre.

# 1. Développement d'une méthode de transmission du CBPV par contact

## 1) Introduction

Le CBPV est déjà connu comme pouvant se propager facilement par contact lorsque les abeilles sont confinées dans la ruche (Bailey et al., 1983). Plus récemment, il a été avancé aussi le rôle des fèces des abeilles infectées dans la dissémination virale au sein de la colonie (Ribière et al., 2007). Cette dernière étude a démontré également qu'une transmission était possible par application du virus sur la cuticule épilée du thorax d'abeilles. Expérimentalement, la transmission peut aussi être réalisée par injection thoracique de  $4 \times 10^4$  copies de virus purifié (Chevin et al., 2012). Toutefois, ces deux voies expérimentales de transmission du CBPV induisent un stress lié à l'injection et à la manipulation individuelle des abeilles qui s'ajoute aux effets de l'infection du pathogène et peut induire des biais expérimentaux.

Afin de diminuer au maximum les stress subits par les abeilles testées, nous avons décidé de développer une méthode, reproductible, d'exposition au CBPV en conditions expérimentales, proche du mode naturel de transmission entre des abeilles infectées, symptomatiques et des abeilles saines (figure 22). J'ai donc mis en présence d'abeilles saines des abeilles préalablement injectées avec une quantité de CBPV connue pour provoquer la paralysie chronique ( $4 \times 10^4$  copies de virus purifié (Chevin et al., 2012)), présentant des signes cliniques de paralysie chronique (3 à 4 jours après l'injection). Ces abeilles injectées ont donc servi d'inoculum en transmettant le virus par contact, remplaçant l'injection thoracique ou l'application du virus sur la cuticule des abeilles.

Afin de définir la proportion d'abeilles préalablement infectées pour obtenir une diffusion virale, suffisante, j'ai testé l'introduction de nombres différents d'abeilles malades par cagettes.

## 2) Matériel et méthodes

Toutes les expériences de chapitre ont été réalisées en cagette, en conditions contrôlées proche des tests standards d'exposition aux pesticides (méthode n° 230 ; Commission des Essais Biologiques and Association Française de protection des plantes, 2014). Cependant, nous avons adapté quelques paramètres au regard du risque infectieux. Notamment, nous avons remplacé l'alimentation en miel et pollen par du Candy vendu sous vide (Apifonda, Südzucker AG, Allemagne) du sirop de saccharose à 50% (D<sup>(+)</sup>-sucrose, Acros Organics, Fisher Scientific, USA) et une solution protéique spécifique (sirop 50% + 1% Provita'Bee, ATZ Diététiques, France), afin d'éviter toute contamination des abeilles mises en cagette. Certains virus sont en effet connus pour être transmissibles *via* le pollen (Singh et al., 2010). De plus, nous n'avons pas non plus standardisé les expérimentations par rapport à l'insecticide référence, le diméthoate. En effet, notre objectif à terme était d'observer l'effet de la co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam relativement aux effets individuels de ces stress, et non en fonction de la référence de toxicité.

Fin avril 2015, des abeilles émergentes provenant d'une ruche sans signe clinique de paralysie chronique ni infection supérieure à la limite de quantification de la PCR quantitative ( $10^{3,9}$  copies/abeille) ont été réparties dans 24 cagettes selon les modalités suivantes : trois groupes d'abeilles exposées mises en présence d'une, de trois ou de six abeilles malades pour 10 abeilles saines (pour chaque conditions : 4 cagettes de 30 abeilles par jour de prélèvement), un groupe de 30 abeilles témoins négatifs (sans mise en contact d'abeilles infectées ; 1 cagette par jour de prélèvement), et un groupe d'abeilles témoin positif (inoculées par voie intrathoracique ; 1 cagette par jour de prélèvement). Les abeilles témoin positif et celles préalablement malades ont reçu la même dose de virus par injection (estimé par RT-PCR quantitative à  $4 \times 10^4$  copies de génomes viraux par abeille). Le suivi a été réalisé à 5, 10, 15 et 18 jours après contact avec les abeilles infectées en analysant les mortalités et la charge virale individuelle de huit abeilles, par RT-PCR quantitative (Blanchard et al., 2012). Les statistiques effectuées comprennent une ANOVA, ainsi qu'un post hoc de TukeyHSD (logiciel PAST) afin de comparer les charges virales des différents groupes.

### 3) Résultats et discussion

Les charges virales des abeilles ne présentaient pas de différences significatives en fonction de la proportion d'abeilles malades ajoutées à la cage, variant de 10% à 30% (Figure 24). Les charges virales des abeilles infectées par injection ne sont pas non plus significativement différentes de celles infectées par mise en présence d'abeilles malades. On observe que de faibles charges virales ont été détectées chez les abeilles du groupe témoin négatif. Cependant, ces faibles charges virales, proches voire en dessous de la limite de quantification de la méthode, sont stables dans le temps et restent significativement inférieures aux charges virales observées dans les abeilles des autres groupes ( $p < 0.05$ ).

Nous avons également procédé à une vérification, afin de savoir si les virus quantifiés résultaient bien d'une répllication chez l'abeille et n'étaient pas simplement adsorbés à la cuticule à l'extérieur des abeilles testées. Ainsi, une quantification sur de nouvelles abeilles a été effectuée après lavage avec du tampon phosphate additionné de RNases (10 U, RNase A, Roche). On observe une différence significative entre la médiane des témoins (Figure 25) et celle des abeilles en contact avec les abeilles infectées ( $p = 0.03$ ). A l'inverse il n'y a pas de différence significative entre les abeilles en contact avec des abeilles infectées et des abeilles ayant subi une injection de CBPV ( $p = 0.06$ ). On peut en conclure que les abeilles en contact avec des malades répliquent le virus, puisque leurs charges sont supérieures à celles des témoins et voisines des charges virales observées chez les abeilles inoculées avec le CBPV.

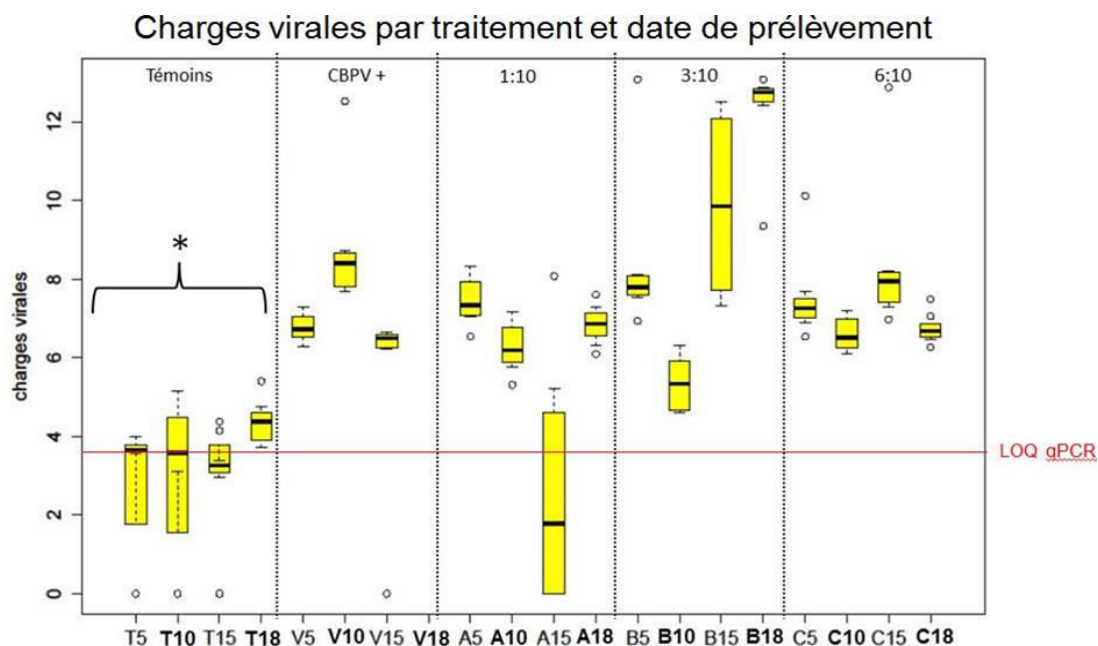


Figure 23 : Représentation graphique des charges virales ( $\log_{10}$  équivalent de copies génome viral par abeille) en fonction modalités d'exposition des abeilles au CBPV : T = abeilles témoin, V = abeilles inoculées par le CBPV, Abeilles au contact d'abeilles inoculées : A = 1 :10, B = 3 :10 et C = 6 :10) et par date de prélèvement (« 5 » dans le graphique = J5, « 10 »=J10, « 15 »=J15, « 18 »= J18 après l'inoculation ou le début de la mise au contact des abeilles symptomatiques de la paralysie chronique). Ligne rouge = limite de quantification de la qPCR ( $10^{3.9}$  copies par abeille).

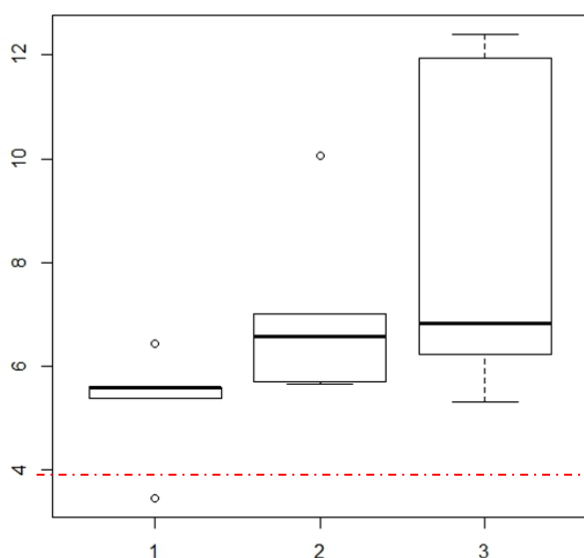


Figure 24 : Vérification des charges après lavage à la RNase. 1 = abeilles témoin, 2 = abeilles au contact d'abeilles inoculées par injection, 3 = abeilles inoculées par injection avec le CBPV ( $4 \times 10^2$  copies/abeille). Ligne rouge en pointillés : limite de quantification ( $10^{3.9}$  copies par abeille).



En conclusion, nous avons développé une méthode *in vitro* de transmission expérimentale du CBPV entre abeilles saines et abeilles malades infectées par contact avec des abeilles préalablement infectées par injection (inoculum). Cette méthode est répétable quelle que soit la proportion d'abeilles « inoculum » et moins invasive qu'une injection directe du virus. Cette méthode permet d'obtenir des abeilles infectées dans des conditions proches du mode naturel de transmission du CBPV au sein de la ruche. Ces travaux ont fait l'objet d'un poster présenté aux 4<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Apicole les 2 et 3 février 2016, présenté en Annexe 1.

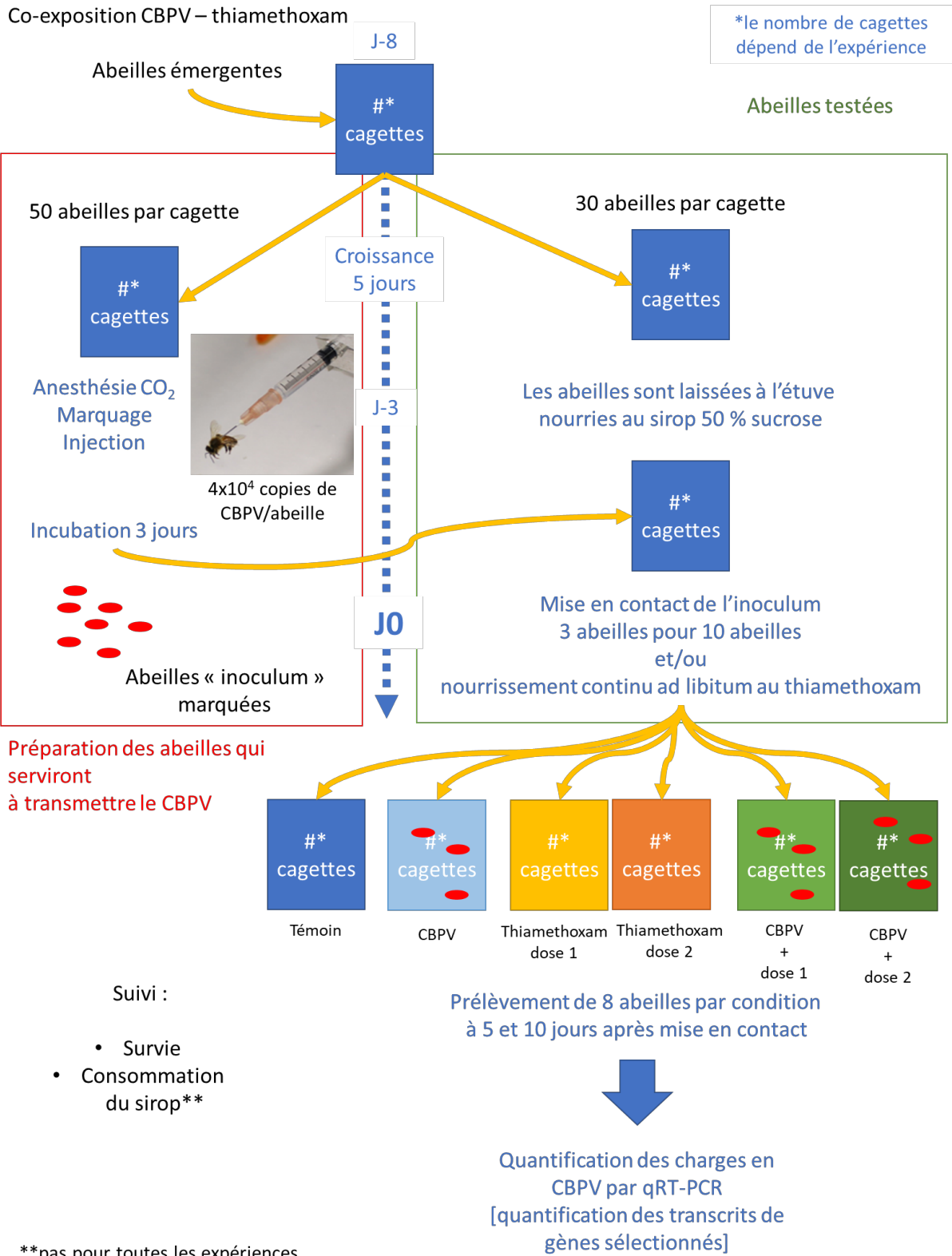


Figure 25 : Schéma récapitulant la méthode utilisée pour tester une co-exposition entre le CBPV et le thiaméthoxam en exposition chronique et conditions contrôlées.

## 2. Métabolisation du thiaméthoxam et co-exposition avec le CBPV

Pour déterminer s'il existait une interaction entre le thiaméthoxam et le CBPV, j'ai utilisé la méthode de transmission non invasive précédemment décrite. J'ai ainsi pu expérimenter les effets conjoints d'une infection par le CBPV et d'une exposition chronique au thiaméthoxam sur la survie, et suivre les charges virales en CBPV d'abeilles en cagettes (figure 25). En amont, j'ai également réalisé une expérience qui m'a permis de montrer la cinétique de métabolisation du thiaméthoxam en clothianidine chez l'abeille domestique (figure 26).

Les résultats obtenus ont été valorisés dans un article accepté dans *Pesticide Biochemistry & Physiology* (Coulon et al., n.d.)(21/10/2017).

## Métabolisation du thiamethoxam

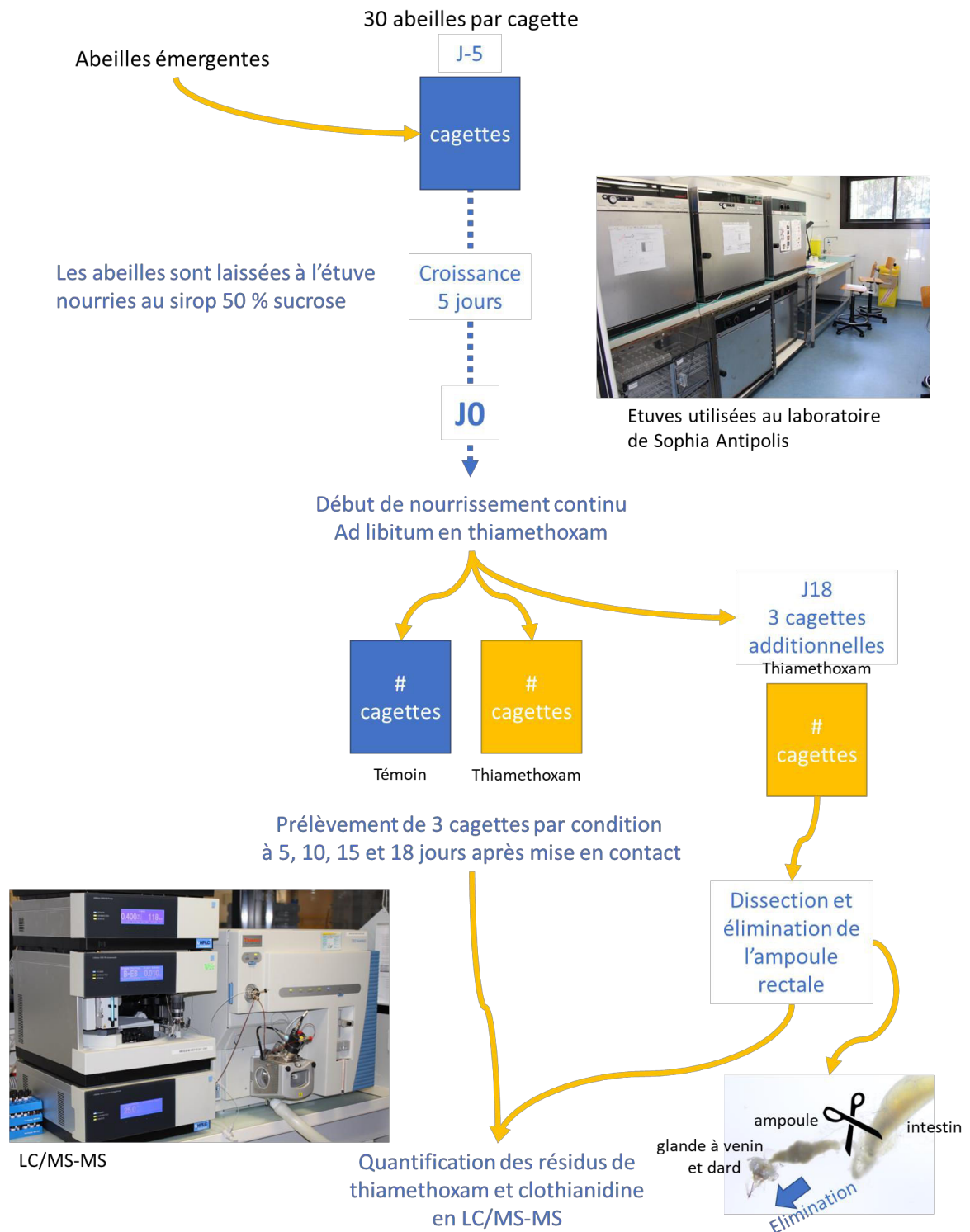


Figure 26: Schéma récapitulant la méthode utilisée afin de suivre la cinétique de dégradation du thiaméthoxam en clothianidine, lors d'une exposition chronique et en conditions contrôlées.

# Article 1:

## Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the *Chronic bee paralysis virus* in honeybees

---

M. Coulon<sup>a, b</sup>, F. Schurr<sup>a</sup>, A.-C. Martel<sup>a</sup>, N. Cougoule<sup>a</sup>, A. Bégaud<sup>a</sup>, P. Mangoni<sup>a</sup>, A. Dalmon<sup>b</sup>,  
C. Alaux<sup>b</sup>, Y. Le Conte<sup>b</sup>, R. Thiéry<sup>a</sup>, M. Ribière-Chabert<sup>a</sup>, E. Dubois<sup>a</sup>

<sup>a</sup>ANSES Sophia Antipolis, Unit of Honeybee Pathology, 105, route des Chappes, 06902  
Sophia-Antipolis, France

<sup>b</sup>INRA PACA, UR 406 Abeilles et Environnement, Site Agroparc, 84914 Avignon, France  
Contact: [eric.dubois@anses.fr](mailto:eric.dubois@anses.fr)

### Abstract

Pathogens and pesticides are likely to co-occur in honeybee hives, but much remains to be investigated regarding their potential interactions. Here, we first investigated the metabolisation kinetics of thiamethoxam in chronically fed honeybees. We show that thiamethoxam, at a dose of 0.25 ng/bee/day, is quickly and effectively metabolised into clothianidin, throughout a 20 day exposure period. Using a similar chronic exposure to pesticide, we then studied, in a separate experiment, the impact of thiamethoxam and *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) co-exposure in honeybees. The honeybees were exposed to the virus by contact, mimicking the natural transmission route in the hive. We demonstrate that a high dose of thiamethoxam (5.0 ng/bee/day) can cause a synergistic increase in mortality in

co-exposed honeybees after 8 to 10 days of exposure, with no increase in viral loads. At a lower dose (2.5 ng/bee/day), there was no synergistic increase of mortality, but viral loads were significantly higher in naturally dead honeybees, compared with sacrificed honeybees exposed to the same conditions. These results show that the interactions between pathogens and pesticides in honeybees can be complex: increasing pesticide doses may not necessarily be linked to a rise in viral loads, suggesting that honeybee tolerance to the viral infection might change with pesticide exposure.

## Keywords

Thiamethoxam, pathogen, synergistic interaction, co-exposure, survival, tolerance

## 1. Introduction

The Western honeybee, *Apis mellifera* sp., is a key ecological species, both for the pollination services it procures (Potts et al., 2010), and for its role as a bio-indicator of environmental pollution (i.e. in-hive concentration of xenobiotics fortuitously collected in the field) (Celli and Maccagnani, 2003; Poquet et al., 2016). During the last decades, an alarming amount of honeybee colony losses has been reported in the Northern Hemisphere (Neumann and Carreck, 2010), and the number of colonies is decreasing whereas demand for crop pollination is growing (Aizen and Harder, 2009; Breeze et al., 2014; Potts et al., 2010). In Europe, overwintering losses ranged from 2.4% to 15.4% and from 0.04% to 11.1% of seasonal losses (i.e. during the foraging season), in 2014 (Laurent et al., 2015). Average losses reached 51.1% over the whole year in the USA for the same period (Lee et al., 2015). These losses can be caused by various factors, including anthropogenic changes (growing use of pesticides, landscape alteration – decrease in resource availability), and introduction of exotic parasites, such as the mite *Varroa destructor*, the microsporidian parasite *Nosema ceranae*, and viruses (Potts et al., 2010). In addition, there is growing evidence that these factors may interact and exacerbate bee mortality (Goulson et al., 2015).

Neonicotinoids, a family of acetylcholine receptor inhibitors, which represented more than 25% of the insecticides on the market in 2010 (van der Sluijs et al., 2013), are increasingly

blamed for causing high mortalities in laboratory conditions, as well as colony losses, either alone (Henry et al., 2012; Tison et al., 2016) or in conjunction with other stress factors (Alaux et al., 2010a; Doublet et al., 2015a; Nazzi and Pennacchio, 2014; Vidau et al., 2011). By binding with high affinity to acetylcholine receptors, they effectively block the binding of acetylcholine and overstimulate cells, leading to paralysis and death of cells and/or of individuals (Nauen et al., 2003). Thiamethoxam, a nitro-substituted neonicotinoid, is one of the most commonly used insecticides worldwide, either as a systemic insecticide in seed coatings, or directly sprayed on crops (Nauen et al., 2003; van der Sluijs et al., 2013). Recent studies have shown sub-lethal effects of low-dose exposure to thiamethoxam during homing flights in honeybees (Henry et al., 2012). In addition, thiamethoxam is known to be converted into its main metabolite, clothianidin, in plants and insects (Benzidane et al., 2010; Nauen et al., 2003). However, the metabolisation kinetics has not been described for honeybees. Clothianidin, which is also commercialised as an insecticide on its own, is reportedly slightly more toxic than thiamethoxam (clothianidin 48 h oral median lethal dose 50% [LD50]: 2.69 ng/bee ; thiamethoxam 48 h oral LD50: 4.41 ng/bee – Laurino et al., 2011). Thiamethoxam is one of the most used pesticides, on crops attracting honeybees (like oilseed rape – Nauen et al., 2003), its potential interaction with pathogens should be investigated.

Indeed, pathogens, and notably viruses, are also frequently incriminated in the decline of domestic honeybees. About 26 honeybee viruses have been described, but only some cause visible symptoms, such as brood and or adult bee mortalities, paralysis or deformed wings, and have been correlated with colony losses (Dainat et al., 2012; Desai and Currie, 2016; Genersch et al., 2010; van Engelsdorp et al., 2013). Among these viruses, the seven most prevalent in the Northern Hemisphere are: *Acute bee paralysis virus* (ABPV) or its related viruses *Israel acute paralysis virus* and *Kashmir bee virus* (forming together the AKI viral complex), *Deformed wing virus* (DWV), *Sacbrood virus* (SBV), *Black queen cell virus* (BQCV), and *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) (Aubert et al., 2008; Genersch and Aubert, 2010; Laurent et al., 2015c; Tentcheva et al., 2004). In USA and France, their prevalence was described to be respectively about 14% to 22% and 17% to 58% for AKI viral complex , 85% and 97% for DWV, 86% for SBV (prevalence in France), 90% and 86% for BQCV, and 16% and 28% for CBPV (Aubert et al., 2008; Laurent et al., 2015c; Tentcheva et al., 2004; Traynor et al., 2016)). CBPV is different in many ways from the other honeybee viruses belonging to the *Picornavirales* order (such as DWV [*Iflaviridae*] or ABPV [*Dicistroviridae*]), which only contains positive RNA strand viruses that translate directly into one polyprotein (Genersch

and Aubert, 2010). Not yet classified, CBPV is close to *Nodaviridae* and *Tombusviridae* virus families, possesses an anisometric structure, and is composed of two separate positive RNA strands (Blanchard et al., 2012; Olivier et al., 2008; Ribière et al., 2010, 2007; Youssef et al., 2015). Despite the virus being present in one quarter of tested hives in France (Tentcheva et al., 2004), only 2% of specific clinical signs (see below) were observed during the French EPILOBEE surveillance programme (Laurent et al., 2015). Most honeybee viruses often cause covert infections: they can be present in a great number of hives and yet not trigger any observable clinical symptoms (Aubert et al., 2008). The onset of an overt infection can be caused by the transmission of the virus by *Varroa destructor*, for DWV, ABPV, IAPV, and KBV, for example (Carreck et al., 2010; Möckel et al., 2011). There is no evidence of CBPV transmission by *Varroa* mite. However, covert infections can evolve into overt infections (with clear clinical symptoms such as piles of dead bees in front of the hives and bees that are unable to fly, with tremors, paralysis, and sometimes a loss of hair and a darker colour of individuals) when CBPV-infected bees have been confined in populous hives for a long period of time (Ribière et al., 2010). The authors suggested that this could be due to bad weather during spring and to the capacity of CBPV to be transmitted by contact among bees, especially when close contact causes abrasion of the cuticle. Individuals developing clinical signs has been measured at  $10^8$  to up to  $10^{10}$  copies of CBPV per honeybee (Blanchard et al., 2012; Chevin et al., 2012). The properties of the CBPV, and the relatively high numbers of infected apiaries, make this virus interesting in co-exposure studies.

A honeybee colony can potentially concentrate pesticides from nearby (up to 10 km) crops through its foraging and storing activity. The hive is also a good place for pathogen development, due to high population numbers and regulated temperature. Because of these two factors, it is highly probable that co-exposure of pesticides and pathogens will occur in the field (Poquet et al., 2016). Such co-exposures can lead to interactions, which can be additive, antagonistic or synergistic, between the stressors (Holmstrup et al., 2010). Significant effects of co-exposure between pesticides and viruses have already been observed, such as an increase in BQCV loads in nurse bees fed pollen containing a mix of chlorpyrifos, boscalid and pyraclostrobine (DeGrandi-Hoffman et al., 2013), or an increase in DWV loads in honeybees exposed to clothianidin (Di Prisco et al., 2013). Doublet et al., (2014) recorded higher mortalities (and an increase in BQCV loads) in honeybee larvae exposed to thiacloprid. Pesticide exposure, by increasing virus loads, could lead to overt infections. The co-exposure



of honeybees to CBPV and thiamethoxam, while likely to occur in the field, has not yet been investigated.

In the present study, we describe the metabolisation kinetics of thiamethoxam into its main metabolite, clothianidin, in honeybees. Then we chronically co-exposed honeybees, in laboratory conditions, to CBPV and to different concentrations of thiamethoxam, in order to measure the effect of a potential interaction on survival, and on viral loads in individual honeybees.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. [Thiamethoxam-contaminated syrup](#)

A certified pesticide standard for thiamethoxam (99% purity) was obtained from Techlab (Saint-Julien-lès-Metz, France). Pesticide concentration in syrup was adjusted to expose honeybees to the intended daily doses, taking into account a previously measured mean daily consumption of 25 µL of 50% sucrose syrup per bee. A standard working solution of thiamethoxam at 100 mg/L (prepared in water) was diluted in 50% sucrose, to obtain the final concentrations of 10 µg/L, 100 µg/L and 200 µg/L, corresponding to the expected daily doses of 0.25, 2.5 and 5.0 ng/bee, respectively. Thiamethoxam syrup solutions were tested to ensure the concentration and the absence of degradation into clothianidin.

### 2.2. [Emerging honeybees](#)

Emerging honeybees were obtained from previously tested healthy colonies selected in ANSES Sophia Antipolis laboratory apiary. For winter experiment, six colonies from this apiary were kept in an indoor apiary (winter apiary) maintained at 25°C, with access to the outdoors for cleansing flights, fed with 50% sucrose syrup, with water, and with paste composed of frozen pollen mixed with Fructoplus syrup (Icko Apiculture, Bollène, France). Emerging honeybees were pooled to minimise colony-born bias and distributed in cages (30 bees per cage of about 780 cm<sup>3</sup>, with a capacity of 100 bees, built from Pain, 1966). The cages were maintained in incubators (34°C, with saturated humidity). Caged bees were fed *ad libitum* with 50% sucrose syrup, and 50% sucrose syrup supplemented with 1% protein

(Provita'Bee, ATZ Diététiques, France), and crystallised sugar paste for 5 to 9 days after emergence. After this “growth period”, the sugar paste and the 50% sucrose syrup supplemented with protein were removed.

### 2.3. [Experiment 1: metabolism kinetics of thiamethoxam](#)

Twenty-eight cages were prepared in January 2016 (overall 840 emerging bees) from four healthy-colonies (winter apiary). After a 5 day “growth period”, twenty-one cages were chronically exposed to 0.25 ng/bee/day of thiamethoxam *via* the sole remaining feeder filled with thiamethoxam-contaminated syrup (10µg/L). Seven control honeybee cages were fed with 50% sucrose syrup without thiamethoxam. Feeders were changed and weighed for syrup intake measurement every day. Survival in all cages was monitored daily.

One control cage was sacrificed (by freezing the bees at -18°C) on day 0 after beginning of the experiment. Then, on day 1, 5, 10, 12, 15, and day 18, one control cage and three exposed cages were sacrificed (for a total of 25 cages). In order to study if thiamethoxam or its metabolite would be excreted by bees in the field, the three remaining cages, fed with thiamethoxam, were sampled on day 18. The bees from these cages were anaesthetised using CO<sub>2</sub> gas and the rectum of each bee was excised by pulling on the last tergite and stinger. All bee samples (whole bees and dissected bees) were stored at -18°C until chemical analysis.

### 2.4. [Experiment 2: CBPV-thiamethoxam co-exposure](#)

Emerging honeybees from three previously tested CBPV-negative colonies were sampled in early July 2015. One group of emerging bees were used to prepare CBPV-infected bees to vector the virus. These bees (n=243) were distributed in 5 cages of 50 honeybees and after 5 days of the “growth period”, they were anaesthetised using CO<sub>2</sub> gas, paint marked, injected in the thorax with  $4.0 \times 10^4$  copies of purified CBPV, and then left to develop the disease for 4 days in a separate incubator, at 34°C with saturated humidity. At the same time, 54 cages (overall 1620 emerging bees) were prepared from the same colonies. At the end of a 9 days growth period, the feeders were removed and the CBPV and/or thiamethoxam exposure started according to the following six conditions (nine cages per condition): 1. Control bees (bees not exposed to CBPV nor to thiamethoxam); 2. Bees in contact with CBPV-infected

bees (introduction of nine symptomatic bees in each cage, which died from the disease within the first 1 to 3 days (24,69% were dead 1 day after introduction in the cage; 82,72% after 2 days, and 91,98% after 3 days), but weren't removed to continue to act as an inoculum); 3. Bees fed 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam (100 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup); 4. Bees fed with 5.0 ng/bee/day (200 µg/L thiamethoxam-contaminated syrup); 5. Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 2.5 ng/bee/day of thiamethoxam; 6. Bees co-exposed to both CBPV-infected bees and 5.0 ng/bee/day of thiamethoxam. Three cages per condition were sampled on day 1, 5 and day 10 after starting the virus and/or pesticide exposure. Survival was monitored daily (unmarked dead bees were removed from the cages, labelled and kept at -18°C). Sampled bees were stored at -18°C until viral analysis.

## 2.5. [Quantification of thiamethoxam and clothianidin](#)

The neonicotinoid residues were quantified from a pool of 20 honeybees from the same cage (whole bees or dissected bees), using liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), according to the protocol described in (Martel and Lair, 2011). Briefly, the pesticides were extracted using acetonitrile and liquid partitioning with *n*-hexane. One clean-up was then performed on a florisil cartridge (1 g, 6 mL) and the extract was analysed by LC-MS/MS.

## 2.6. [Quantification of viral loads](#)

CBPV load was measured in nine unmarked (i.e. not injected) individual honeybees sampled from the three cages sacrificed at each sampling date (three bees from each cage), or in nine (or as many as possible) dead bees (unmarked) collected at the same sampling date. Each honeybee was crushed in 1 mL 0.01 M phosphate buffer using three tungsten 0.5 mm beads and a TissueLyser (Qiagen) for 30 s at 30 Hz, and repeated three times. The resulting homogenate was then clarified by two successive centrifugations of 10 min, at 8000 x *g* and 4°C. Viral RNA was extracted from 200 µL of supernatant using High Pure Viral RNA kits from Roche Diagnostics, according to the manufacturer's instructions. RNA was recovered in 50 µL of 10 mM Tris-HCL, pH 8.5, supplied in the kit. Retro-transcription into cDNA was performed using random primers and SuperScript's SSRT II kit (Invitrogen) from 12.5 µL of purified RNA (Ribière *et al.*, 2002). Quantitative PCR was carried out on 5 µL of

complementary DNA using protocol and primers from Blanchard et al. (2012) (limit of quantification, LOQ: 3.9 log<sub>10</sub> copies per individual).

## 2.7. [Statistics](#)

Survival was established using a Kaplan-Meier estimation (Efron, 1988; Pepe and Fleming, 1989) which allows taking into account the sampled bees in whole cages as censored data (individuals removed from the experiment, but not dead), and curves compared with log-rank tests (Bland and Altman, 2004). Log-transformed viral loads were analysed using a one-way ANOVA test followed by post-hoc *t*-tests or Tukey HSD tests (de Miranda et al., 2013). Synergistic interactions were tested using a  $\chi^2$  of compliance test comparing obtained survival measurements for each day with the corresponding calculated expected measurements (Aufauvre et al., 2012; Mcvay et al., 1977).