



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



SIReNa



LABORATOIRE SOLS
& ENVIRONNEMENT

THÈSE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MENTION : ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITÉ, ECOSYSTEMES

soutenue publiquement par

Sandhya MALLADI

le 19 décembre 2023

Évaluation de l'impact de cocktails de néonicotinoïdes
sur la qualité de la réponse immunitaire chez *Apis
mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster* en
utilisant un plan multifactoriel : une étude cytomique

Membres du jury

Pr. Christine BRAQUART-VARNIER, Université de Poitiers

Présidente, Rapporteuse

Pr. Marylène POIRIÉ, Institut Sophia Agrobiotech

Rapporteuse

Dr. Marie-Pierre CHAUZAT, ANSES France

Examinatrice

Pr. Philippe LAVAL-GILLY, Université de Lorraine

Directeur de thèse

Pr. Jaïro FALLA-ANGEL, Université de Lorraine

Co-directeur de thèse



INRAE



THÈSE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

MENTION : ECOTOXICOLOGIE, BIODIVERSITÉ, ECOSYSTEMES

soutenue publiquement par

Sandhya MALLADI

le 19 décembre 2023

Évaluation de l'impact de cocktails de néonicotinoïdes
sur la qualité de la réponse immunitaire chez *Apis
mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster* en
utilisant un plan multifactoriel : une étude cytomique

Membres du jury

Pr. Christine BRAQUART-VARNIER, Université de Poitiers

Présidente, Rapporteuse

Pr. Marylène POIRIÉ, Institut Sophia Agrobiotech

Rapporteuse

Dr. Marie-Pierre CHAUZAT, ANSES France

Examinatrice

Pr. Philippe LAVAL-GILLY, Université de Lorraine

Directeur de thèse

Pr. Jaïro FALLA-ANGEL, Université de Lorraine

Co-directeur de thèse

GAMSJOCH

dedicated to Amma, Dad, Divya, and Srinivas
ad astra per aspera



© Sandhya Malladi

REMERCIEMENTS

It took a very, very large village to raise me, and this thesis...

In the summer of 2022- the end of my second year with this thesis, I hiked the most difficult trail of my entire life: **Gamsjoch**, a mountain range in Austria primarily consisting of 3 peaks. At the time, I saw those three peaks as representative of the three years of my thesis; I was only able to climb two of those peaks, reaching altitudes of 1950 m. The third peak was extremely difficult, becoming symbolic of what would be the third year of my thesis. I decided that I would name my thesis **Gamsjoch**, and the fact that I had scaled even two of those mountain peaks in Karwendel motivated me throughout the figurative third peak of my PhD.

These three years have been the most tumultuous of my life. To say it has been an emotional rollercoaster would be an understatement. I've missed out on marriages of my dear friends and births of their children, I've missed birthdays, funerals, family trips, girls' trips, trips in general and, even more sadly, being there for my loved ones in times of grief. I've felt crippled and wholly inadequate- as a friend, a partner, a sister, a daughter, and even sometimes, a human being. I've been lonely, frustrated, and scared. I've lost my temper and hurt the people around me. I've let myself down, and sometimes I've let others down too. I've fallen, more times than I can count. All this, exacerbated by the COVID-19 pandemic which set the stage at the start.

At the same time, these three years have given me some of the most beautiful experiences I could ever hope to have, allowing me to cherish the most wonderful people I could ever hope to know, near and far. I would not have survived this thesis, let alone grow in character and strength, were it not for their help, comfort, support, love, and encouragement. The words on the following pages, in French and in English, may not amply express the breadth of my gratitude but I will try my best.



Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le **Pr. Philippe Laval-Gilly**, pour votre soutien bienveillant, votre confiance et vos précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. J'aimerais également exprimer ma gratitude à mon co-directeur de thèse, le **Pr. Jaïro Falla-Angel**, pour votre soutien et pour m'avoir fait part de vos réflexions au cours de ces trois dernières années. Je vous suis sincèrement reconnaissante à tous les deux pour cette opportunité unique et incroyable de contribuer à la protection de l'abeille mellifère.

Ensuite, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury, le **Pr. Christine Braquart-Varnier**, le **Pr. Marylène Poirié** et le **Dr. Marie-Pierre Chauzat** pour avoir pris le temps de critiquer mon travail, et de reconnaître son importance et sa pertinence dans le contexte environnemental actuel,

en m'encourageant à défendre mes travaux de recherche avec la fierté, l'intégrité et la grâce. Je vous remercie chaleureusement pour vos précieux conseils.

Je tiens à remercier la **Communauté d'agglomérations « Porte de France - Thionville »** pour leur soutien financier.

Merci beaucoup à **Pr. Michel Aillerie**, **Dr. Sabine Azoury** et **Dr. Ali Kanso** qui m'ont aidée, grâce à leur participation à mon CSI, en me donnant leurs réflexions et conseils ainsi que leurs encouragements.

I would also like to thank **Dr. Louise Walderdorff**, my M2 internship mentor who taught me a lot about cell culture and who gave me a kickstart in honeybee research. Thank you very much **Louise**! A big thank you to my first, best and only intern, **Laura Wilson**. Your cheerful nature and great work ethic really made it a pleasure to be your internship mentor. Un grand merci à **Dr. Laura Wechtler**, qui m'a beaucoup aidée pendant ma première année en doctorat (surtout pour m'avoir prêté une partie de ton bureau pendant mon stage tout au début! ☺). Merci aussi à **Dr. Sonia Henry** et **Dr. Emmeline D'Incau** pour leurs conseils pendant ma thèse.

J'aimerais remercier sincèrement l'équipe de l'IUT Thionville-Yutz pour le rôle qu'elle a joué dans mon parcours professionnel : **Dr. Antonietta Specogna**, je vous remercie profondément pour votre soutien et empathie, surtout quand j'en avais besoin ; **M. Benoît Herbert**, je vous remercie pour votre aide administrative ; **Antoine Bonnefoy**, merci beaucoup pour ton aide précieux, surtout avec mes manips, les ruches et même mon vélo ! **Patrick Arnault**, merci pour ton aide numérique jusqu'au jour de ma soutenance. **Sarah Berns**, un grand merci à toi pour ta bonne humeur, ta bienveillance, nos conversations avec ou sans café. Je te souhaite bon courage pour la suite !

Je tiens à remercier, en particulier, les personnes qui ont assuré mon séjour brillant et joyeux à l'IUT. **Aurélié**, ta personnalité pétillante, ta bonne humeur et ton efficacité (on dirait magique!) dans toutes les démarches administratives m'ont beaucoup aidée – merci ! ; **Corinne**, ton soutien, en particulier lorsqu'il s'agit de déclarer mes impôts en France, est inestimable et je t'en serai toujours reconnaissante ; **Vanessa** and **Sabrina**, merci pour votre bonne humeur, votre empathie et vos aides avec l'organisation de mes jours à l'IUT ; **Marie**, merci beaucoup pour ton accueil à la bibliothèque ou j'ai installé mon deuxième bureau, pour nos merveilleuses conversations et pour avoir été toujours à l'écoute pendant des journées infernales ; **Frank** et **Benjamin**, merci beaucoup pour votre soutien technique et surtout pour votre gentillesse et votre attitude joviale chaque jour tout au long de ces trois dernières années ; **Katherine**, merci pour nos conversations et aussi pour toute l'aide que tu m'as apportée avec l'autoclave ; **Munira**, merci pour ton beau sourire et ta gentillesse ; **Daniel**, merci pour ta bonne humeur et tes encouragements !

Chaque jour depuis trois ans, j'ai profité de la cuisine extraordinaire à CROUS-Cormontaigne où les personnels qui y travaillent ont fait de l'heure de déjeuner la meilleure partie de mon boulot. **Marie**,

Caro, Béatrice, Myrail, Magalie, Christine et Claudine, je vous remercie chaleureusement du fond de mon cœur - merci pour les conversations, vos sourires brillants, vos encouragements, les plats délicieux, les desserts que j'ai souvent mangés en double et votre soutien jusqu'à aujourd'hui. Vous avez nourri non seulement ma santé mais aussi mon esprit et mon âme.

Cette thèse a été rédigée, entre autres, à #FoxCoffee à Metz, où, grâce à son équipe bienveillante et sympathique, au long de ces trois dernières années, j'ai vécu plein de bons moments. Je vous remercie chaleureusement.

This thesis has brought me into the lives of those who taught me skills I would otherwise have never had the opportunity to learn. J'ai appris l'art et la science de l'apiculture grâce au **Pr. Michel Aillerie**, une personnalité hors du commun qui m'a prise sous son aile et m'a motivée à chaque étape. **Michel**, je te suis très reconnaissante, ainsi qu'à **Sylvette**, pour tout ce que tu m'as appris, pour tout le temps que tu m'as consacré et pour ta confiance inébranlable en moi. Grâce à toi, je suis une bonne apicultrice et une meilleure personne.

I've learnt to science thanks to the newly minted **Dr. Dani Sukkar**, my officemate, and my dear friend. Thank you, Dani, for answering every single, silly question I've ever asked, for your compassion, your help and guidance in the lab and your unwavering encouragement. Thank you for the coffee and the coffee-breaks, the pep talks, and the lunch conversations. You have been there for me *every single day*, even on the days you felt down and out. My gratitude to you knows no bounds. I am so proud of you, and I know you are proud of me too. You not only told me to "Just do it TM" but you also showed me how.

Thank you to **Dr. Sadaqat Ali**, for looking out for me as a brother would. Bhaiyya, bahut bahut shukriya! Thank you, **Xin**, for giving me lots of snacks, courage, and your laughter. I know you will do a great job when you defend your thesis! Fighting!

Thank you to **Nadège Oustrière** and **Julien Castelin**, from my years at JUNIA ISA, for being the amazing professors you are, for checking in on me every year even after I graduated, and for believing in me and my work - you truly believe that I am destined for great things and that helps, especially on the days I don't see it for myself. **#SMaP**

L'une des choses qui m'a permis de soigner ma santé mentale, rester saine d'esprit, stable et pleine de vie depuis 2021 est **CrossFit Hiringa**. Merci à **Vincent**, pour cette espace bienveillante et d'avoir réuni une équipe de coachs formidables, en particulier - **Julie**, ton énergie est revigorante et m'aide à combattre mes insécurités chaque jour et **Loris**, ta bonne humeur et ta nature joviale ont rendu chaque session amusante et gratifiante.

Merci à **Julien** et **Joseph** pour chacune des fois où vous avez été là pour moi - pour venir me chercher et me ramener à la maison en toute sécurité, avant et après chaque séance de CrossFit et

pour m'encourager, que ce soit dans la salle ou pour ma thèse. **Joseph**, tu m'as supportée pendant 24 heures de CrossFit, bravo ! **Julien**, merci pour ton écoute durant ces trois dernières années ! **Émilie**, merci pour tes super soirées durant l'année, ta gentillesse et merci également pour m'avoir supportée pendant les 24 heures du CrossFit !

Merci, en particulier, à **Guillaume**, pour m'avoir permis de briller comme un rayon de soleil, pour m'avoir fait rire et pour avoir été un coach et un ami formidable. Merci, **Aline**, d'être joyeuse même après une longue journée de travail et d'être enthousiaste pour moi et ma thèse, et aussi d'aimer les mimosas autant que moi. ☺ Je veux être aussi forte que toi quand je serai grande !

Je suis très reconnaissante qu'après une longue journée de travail, souvent compliquée, parfois infernale, j'aie pu rentrer à la maison avec des colocataires merveilleux, intelligents et drôles (anciens et actuels, tous mes préférés et énumérés ci-dessous) : J'ai eu le plaisir de partager avec eux d'innombrables brunchs, déjeuners, dîners, raclettes, pique-niques, apéros, soirées films et voyages. Ils m'ont aidée à faire de la France ma maison, et c'est aussi grâce à eux que mon français est aussi bon qu'il l'est aujourd'hui.

Honoré, un grand merci beaucoup de m'avoir motivée à terminer cette thèse, mais aussi de m'avoir encouragé à rester sportive, pour toutes nos discussions autour d'un petit déjeuner, d'un dîner ou d'un verre, pour avoir veillé sur moi - "la petite Indienne", pour m'avoir écoutée (surtout mes blagues très drôles), pour ton aide à chaque fois que j'en ai besoin et aussi pour tous les fruits et légumes de ton potager ! Ton cœur est aussi grand que toi ! **Laura**, merci de m'avoir guidée dans cette thèse, de m'avoir écoutée divaguer et d'avoir supporté mes [bonnes] blagues, pour tes jeux de société, pour les tasses de thé chaudes et pour nos conversations. **Lisa**, un super grand merci, d'abord pour tout le soutien, la motivation et la gentillesse que tu m'as apportées et ensuite pour toutes les pâtisseries que tu nous as faites (surtout les gâteaux marbrés sans marbre ! ☺), les repas que tu m'as préparés, Noël avec ta merveilleuse famille, les soirées films Studio Ghibli, le temps que tu as passé avec moi et pour nos conversations, avec ou sans café.

Thomas, tu as été un colocataire et, maintenant, un ami merveilleux. Je suis reconnaissante pour nos conversations, nos randonnées, nos balades à vélo et nos voyages amusants au cours de ces dernières années, soit à Montpellier soit à Metz. Merci également à **Pauline** pour son soutien et ta bonne humeur pérenne. Vous avez tous les deux été là pour moi, surtout les week-ends où je me sentais seule ; j'apprécie vraiment les déjeuners du dimanche que nous avons partagés à Metz. **Benjamin** et **Noémie**, merci beaucoup pour vos personnalités joyeuses et ensoleillées. Merci surtout pour toutes les pâtes et autres plats faits maison que vous avez souvent partagés avec moi ; j'apprécie vraiment tout cela.

Titouan, tu as été mon fidèle supporter, tu m'as poussée à terminer cette thèse. Merci pour les merveilleux souvenirs que tu m'as permis de créer dans les Pyrénées, à Pau, à Tarbes et aussi ici à Metz ! #dancingElmo. **Aurélie**, et **Geoffrey**, je vous suis très reconnaissante, à vous, et (avec

Titouan) à toutes les soirées du 4ème étage. Merci de m'avoir invitée à Lyon et de m'avoir ouvert votre maison à Bordeaux et aussi pour ce vol inoubliable dans le Robin DR-400. **Aurélie**, merci également de croire en moi, de m'écouter et de prendre régulièrement de mes nouvelles, tu es vraiment formidable.

Merci également à **Laura** et **Sophie** du 4ème étage pour votre temps, votre motivation et votre écoute et aussi pour tous les beaux moments passés ensemble. Un grand merci à **Arnaud**, pour s'être intéressé à mes recherches et m'avoir poussée à finir cette thèse, pour les repas partagés et les soirées cinéma à Metz. Merci également à **Valentin**, **Isabelle** et **Jean-Paul** pour votre gentillesse, pour m'avoir ouvert votre maison et votre ferme dans la campagne française. Je pouvais toujours compter sur une bonne tarte lors de mes visites et c'est tout simplement fantastique.

A big thank you to **Maamma** (my grandmother), my aunt **Vasanth** and my uncle **Rusk** for believing in me from day one. You knew I could do this even when I didn't think so. Your support from afar has been motivating and pushed me to make our family proud. A heartfelt Thank you to **Thatha** (my grandfather) and **Ammamma** (my grandmother), for instilling the value of education and independence in your daughter, in India, at a time when this was an unusual and unlikely opportunity. You raised a strong, capable woman who was then able to raise me.

I am truly blessed to have a circle of friends and mentors that spans not only France but also the world. Thank you, **Flor**, for your honesty, patience and understanding, for being a friend and a sister, for making Marseille an *experience*. You introduced me to CrossFit and made me believe I am great as I am. Let's have wine and build IKEA furniture again, one day! Thank you, **Manuel**, for your support, your good humour, patience and understanding. I appreciate all the good vibes and positive energy you bring to our friendship. Both of you have been there for me since our days at ISA and I am very grateful.

Mes parents français, **Hannah** et **Julien**, et mes petits frères **Tom** et **Sohan** - je vous remercie du fond de mon cœur pour votre présence dans ma vie. **Hannah**, you have been an incredible pillar of support and joy in my life these last 4 years. You took care of this little "stagiaire" like your own sister and taught me so many ways to be a strong, brave woman. I enjoyed all the big and little moments we have had thus far, from the movie nights while doing our nails, cooking together, and getting coffee at Fox to the hikes in the Vosges and trips around France (and Berlin!). I don't have the words to thank you properly, but I am grateful for you every day. I could not have finished this thesis without your support. I am also thankful to your parents, **Thomas** and **Barbara**, for their support and encouragement. **Julien**, je te remercie du fond de mon cœur pour ton soutien, ta bonne humeur, ton affection et plus particulièrement, merci d'avoir corrigé mon français ! Tu m'as ouvert ta maison et ta famille, en me traitant comme ton troisième enfant et j'en suis à la fois reconnaissante et honorée.

Michael, that last boost of confidence I got from your visit before my defense was what I needed. Your quiet and positive energy has always been a source of strength for me. Thank you for reaching out every single time, for your empathy and kindness and for your good humour. #shadesofgreen. **David**, thank you for always checking in on me, for your wonderful smile and jovial attitude, for steadfastly believing in me and my ability to get this dissertation done and for telling me exactly that every chance you get.

My tribe of sisters has been a constant, unwavering support system for over a decade now. They have, through the way they live their unique and creative lives, inspired me to go above and beyond what I thought I was capable of achieving. Nama'stay Good Aunties - **Brianne, Brittney, Whitney, Chelsea, and Maya** – you have been empathetic, understanding, motivating, encouraging and honest with me, especially when the chips were down, and when I was radio-silent. I can count on your input and help, day, or night, regardless of our time zone differences and the distance. Thank you so much for including me, believing in me and supporting my dreams no matter what, even when they are as crazy as “I want to move to France!” or “Feel fi a PhD”. **Audi**, your compassion and wisdom has been a cornerstone of our friendship, spanning over two decades. We were two little girls sitting near the piano by the Grade 8 steps, unaware at how strong our bond would grow. Thank you for listening to me and sharing my frustrations, for believing in me this whole time, for giving me advice and honesty, and being so wholly proud of me with your chest. Wi likkle but wi tallawah.

Axel, thank you for being an amazing partner to me these last 5 years. You supported me in so many ways, always treating me with empathy, kindness and patience; you saw the best and worst of me and happily showered me with love and affection. Your good humor carried me through the worst days of this thesis, and I took comfort in knowing you were only ever a phone call or bus ride away (even though that bus ride was 9 hours long!). Thank you for organizing all those trips, the meals and the new and unique experiences that are now cherished memories. I learnt to trust my abilities by watching you. My words cannot ever express how grateful I am to you. I could not have finished this thesis without your support. Vielen Dank an deine Familie- **Kerstin, Horst, Mathias, und Natalia**, euere Türen waren immer für mich offen, besonders jedes Jahr zu Weihnachten und Ostern. Ich schätze all die Unterstützung und die Ermutigung und natürlich das gute Essen.

Maya, the last three years have been a drop in the bucket of our friendship spanning over two decades. You've seen the worst and best of me during this experience and listened to me through all my tears and frustration. I am at a loss for words here, but I know you know how much our sisterhood means to me. I could not have finished this thesis without your support. Thank you for the beach trips and amazing vibes from wah day, your postcards, the funny videos and puzzles, the late night/early-morning, several-hours-long video calls, laughing at -and with- me (one day you will see how funny I truly am) and for the unforgettable Christmas Diaries in Paris and London when I first moved here. You inspire me to try new things, including moving to a new country and challenging my creativity. You are my person.

I would like to dedicate my thesis to my **Amma**, to my **Dad**, to **Divya**, my sister and to **Srinivas**, my brother. You are the people who have been my biggest supporters and cheerleaders since the beginning. You put me first, regardless of the challenges you face, or the time zones you live in. I know you are very proud of my work and of me. I miss you guys. I love you very much. The words on this page will never do you justice, but here they are:

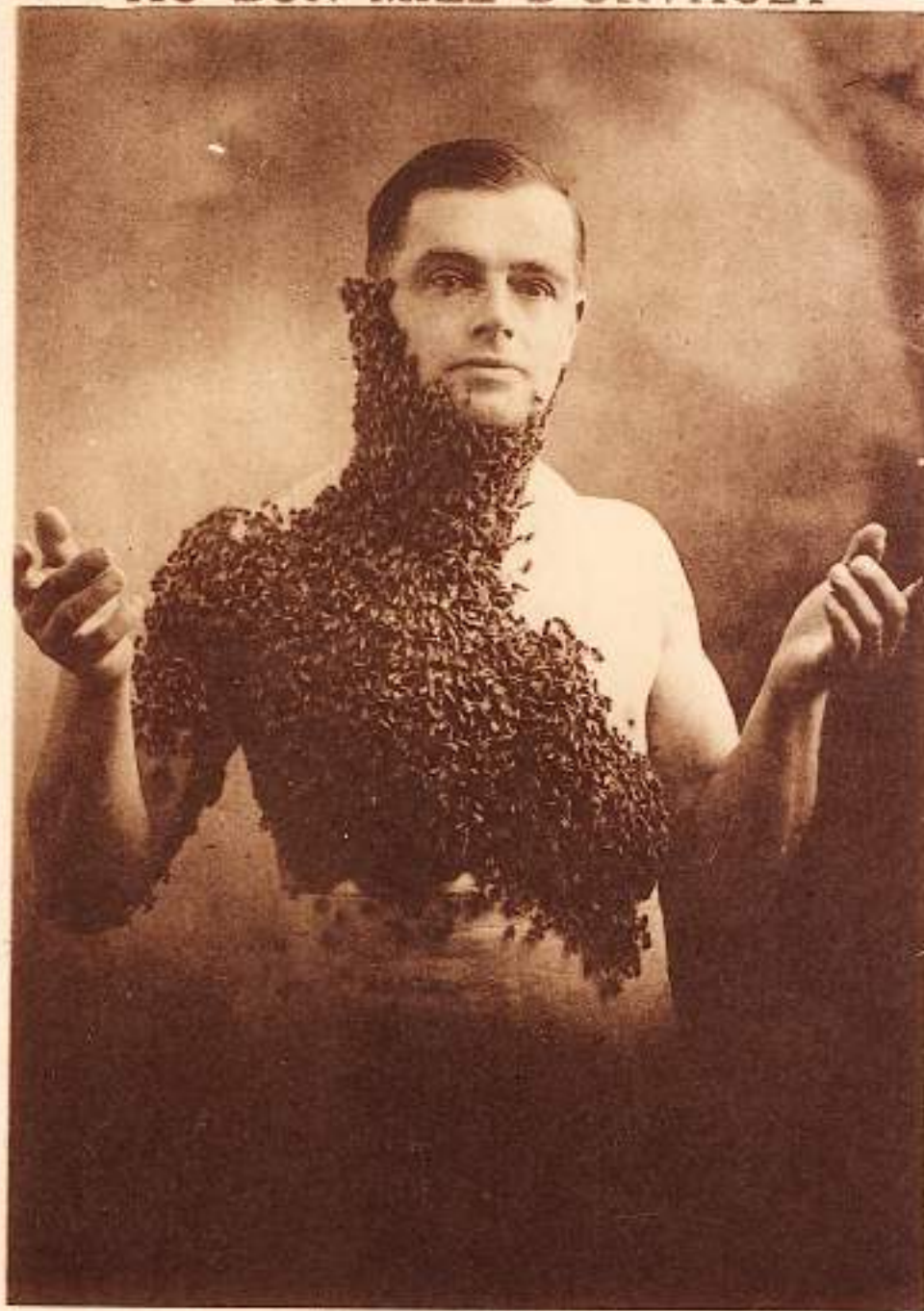
Divya, thank you for always protecting me and being there for me in the ways I need. You're a very potent inspiration in my life. Your strength, kindness and passion for knowledge is incredible and I aspire every day to nurture the same for myself. Thank you for being there for me every step of the way, for your great humour and unwavering belief in me.

Srinivas, thank you for your steadfast belief in me all these years. You have been one of my biggest motivators and cheerleaders. Every problem I ran to you with, you had a practical solution and a great sense of humour to help me through. You're an inspiration to me (and I want to be just like you when I grow up!) and I keep learning so much from you.

Dad, you always said, "*this too shall pass*" and, it did. I am so grateful to you- for your wisdom, your great humour and your critical and practical thinking skills that have been able to calm me down when I panic. You instilled in me a deep love for reading, perhaps wondering if I'd "read" for a doctoral dissertation one day (even if it is in a different language!). You told me what I needed to hear, even when I did not want to hear it, during some of the most difficult days. Thank you for supporting my dreams.

Amma, wow. We did it. "Thank you" will never be enough. You are the strongest person I know, and I am so lucky for that. You have helped me overcome every obstacle that has ever stood in my way. You believed in every dream I have shared with you and sacrificed everything you possibly could to get me to where I am today. Your belief in my education and independence has been the foundation of everything I have ever been able to achieve. You're my role model and my superhero all in one. I am so happy that I shared this milestone with you in person. Thank you for all of it. If I could inherit half your strength...

AU BON MIEL D'ORVAULT



Louis AILLERIE

Apiculteur

ORVAULT (Loire-Inférieure)

Cette photo est reproduite avec l'aimable permission de Michel Aillerie©

COMMUNICATIONS

Publications :

Malladi, S., Sukkar, D., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., Laval-Gilly, P. (2023). Imidacloprid and acetamiprid synergistically downregulate *spaetzle* and *myD88* of the Toll pathway in haemocytes of the European honeybee (*Apis mellifera*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 104, 104323. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104323>

Sukkar, D., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Malladi, S., Azoury, S., Kanso, A., & Falla-Angel, J. (2023). Differential Production of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide among *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, and *Mamestra brassicae* Immune-Activated Hemocytes after Exposure to Imidacloprid and Amitraz. *Insects*, 14(2), 174. <http://dx.doi.org/10.3390/insects14020174>

Publications dans le domaine de la thèse

Beaumelle, L., Tison, L., Eisenhauer, N., Hines, J., Malladi, S., Pelosi, C., Thouvenot, L., & Phillips, H. R. P. (2023). Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, 60, 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14437>

Présentation par Poster :

Malladi, S., Falla-Angel, J., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P. (2021). Etude comparative de la réactivité des cellules du système immunitaire (invertébrés et vertèbres) vis-à-vis des pesticides. Colloque 2021 SEFA, 28-29 juin 2021 Versailles, France

Malladi, S., Falla-Angel, J., Bonnefoy, A., Laval-Gilly, P. (2021). Comparative study of the reactivity of immune system cells (invertebrates and vertebrates) vis-à-vis pesticides. Séminaire SiReNa Mars 2021, *en distanciel*, France

TABLE DE MATIÈRES

LISTE DE FIGURES.....	iii
LISTE DE TABLEAUX.....	VII
LISTE DE ANNEXES.....	IX
LISTE D'ABBRÉVIATIONS.....	XI
INTRODUCTION GÉNÉRALE	2
1 ETAT DE L'ART.....	8
1.1 LE MONDE ET LA BIODIVERSITE	8
1.1.1 Déclin de pollinisateurs et ses conséquences.....	10
1.1.2 Pollinisateurs : gardiens de sécurité alimentaire	12
1.1.3 Pollution Environnementale	18
1.2 IMMUNOLOGIE.....	27
1.2.1 Le système immunitaire : complexe et interconnecté	27
1.2.2 Les Réponses Immunitaires.....	28
1.2.3 La Phagocytose.....	33
1.2.4 Les Espèces Réactives d'Oxygène : ROS.....	36
1.2.5 L'expression génétique : voie Toll.....	39
1.3 OBJECTIF	42
2 MATERIELS ET METHODES	46
2.1 DEMARCHE SCIENTIFIQUE : GRAPHIQUE	46
2.2 CULTURE CELLULAIRE.....	46
2.2.1 Hémocytes de <i>Drosophila melanogaster</i> : cellules de Schneider-2	46
2.2.2 Hémocytes d' <i>Apis mellifera</i> et de <i>Bombus terrestris</i>	48
2.3 EXPOSITION CELLULAIRE	49
2.3.1 Activation immunitaire : Peptidoglycane.....	50
2.3.2 Exposition aux néonicotinoïdes : Imidaclopride, Acétamipride.....	51
2.4 MESURE DE LA REACTIVITE CELLULAIRE APRES EXPOSITION.....	53
2.4.1 Viabilité	53
2.4.2 Détection de espèces réactives d'oxygène (ROS) : H_2O_2	54
2.4.3 Phagocytose.....	55
2.5 MESURE DE L'EXPRESSION GENETIQUE APRES EXPOSITION	58
2.5.1 Extraction de l'ARN	59
2.5.2 Synthèse de l'ADNc.....	60
2.5.3 Conception et optimisation du protocole RT-PCR/qPCR.....	60
2.5.4 RT-PCR/qPCR.....	62
2.6 ANALYSES STATISTIQUES.....	63
3 RESULTATS ET DISCUSSION.....	68

3.1	IMPACT DES NEONICOTINOÏDES (IMI, ACE) SUR LA VIABILITE CELLULAIRE	68
3.2	IMPACT DES NEONICOTINOÏDES (IMI, ACE) SUR LA PHAGOCYTOSE.....	76
3.2.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	76
3.2.2	<i>Apis mellifera</i>	78
3.2.3	<i>Bombus terrestris</i>	79
3.3	IMPACT DES NEONICOTINOÏDES (IMI, ACE) SUR H ₂ O ₂	83
3.3.1	<i>Drosophila melanogaster</i>	84
3.3.2	<i>Apis mellifera</i>	86
3.3.3	<i>Bombus terrestris</i>	88
3.4	IMPACT DES NEONICOTINOÏDES (IMI, ACE) SUR L'EXPRESSION GENETIQUE DE <i>SPAETZLE</i> ET <i>MYD88</i>	93
3.4.1	<i>Apis mellifera</i>	93
3.4.2	<i>Bombus terrestris</i>	99
4	DISCUSSION GÉNÉRALE.....	104
4.1	LES MELANGES DE NEONICOTINOÏDES	104
4.2	LES ABEILLES	105
4.3	LES BOURDONS	107
4.4	LES ESSAIS <i>IN VITRO</i> ET LES ETUDES DE LARVES	108
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	112
	REFERENCES.....	120
	ANNEXE I	146
	ANNEXE II	147
	ANNEXE III	149
	ANNEXE IV	150
	ANNEXE V	151
	ANNEXE VI.....	152
	ABSTRACT.....	154

LISTE DE FIGURES

Figure 1 : Les facteurs de changement global, tels que la pollution, la modification de l'utilisation de terre et mer, et le changement climatique, ont entraîné un déclin significatif de la biodiversité dans le monde entier. L'exploitation directe des terres et des mers par l'agriculture et la déforestation, ainsi que les changements dans leurs utilisations, sont considérées comme des facteurs directs découlant de causes géographiques et sociétales, et sont responsables de plus de 50 % de l'impact mondial. Les causes spécifiques de l'impact anthropique comprennent l'utilisation de pesticides et de fertilisants et sont souvent cumulables avec les maladies. (IPBES et al., 2019)9

Figure 2 : graphique en forêt illustrant la tendance de l'abondance (abondance) et la biomasse (biomasse) des invertébrés terrestres (brun) et aquatiques (bleu). Une réduction dans les nombres de insectes terrestres (l'abondance et la biomasse) à 0.92% par an (-8.8% par décade) a été observé. Par contre, il y a avait une augmentation des insectes aquatiques à 1.08% par an (+11.3% par décade). (Van Klink et al., 2020)10

Figure 3 : Pollinisation des fleurs avec des insectes. Les insectes pollinisateurs (abeilles, bourdons, papillons) sont bien adaptés pour transférer et déposer les grains de pollen entres les fleurs. Ce transfert et dépôt est fait quand les insectes butinent pour le nectar et autres sources de nutriment. Source : (Dobbs, 1750) source : Encyclopædia Britannica (<https://www.britannica.com/science/pollination#/media/1/467948/148672>).....13

Figure 4 : Carte du monde illustrant la dépendance de l'agriculture mondiale sur la pollinisation en (A) 1961 et (B) 2012, selon les données de FAO. Suivant la méthodologie de Aizen et al. (2009), cette dépendance peut être comparable et liée directement à une réduction d'alimentaire globale en cas de perte de pollinisateurs. (IPBES et al., 2016)14

Figure 5 : macrophoto de **a.** *Apis mellifera* (source : Lightcubex/Flickr) et **b.** *Bombus terrestris* (source : Helen M Bushe/Flickr) en train de butiner.....15

Figure 6 : classification taxonomique de l'*Apis mellifera* et du *Bombus terrestris* dans l'ordre Hyménoptère.....16

Figure 7 : Structure chimique de **a.** nicotine, **b.** imidaclopride avec le groupe nitroimine (rouge) est donc « nitrosubstitué » et **c.** acétamipride avec le groupe cyanoimine (bleu) est donc « cyanosubstitué ». Image modifié du (Nakayama et al., 2019).....21

Figure 8 : Panneau d'avertissement pour l'Imidaclopride et l'acétamipride (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002).....22

Figure 9 : voies d'expositions aux pesticides systémiques vis-à-vis les abeilles mellifères. (IPBES et al., 2016)25

Figure 10 : Effets sublétaux de néonicotinoïdes chez les abeilles mellifères aux trois niveaux d'études : moléculaire, physiologiques, organisme. (IPBES et al., 2016)26

Figure 11 : Les deux bras fonctionnels sont l'immunité Humorale, qui consiste en les molécules circulantes et l'immunité Cellulaire qui en compose des cellules circulantes tels que les hémocytes. Ce

système, activé par des pathogènes qui contiennent des activateurs immunitaires, peut être aussi décrit en termes de sa réactivité : les réponses immédiates sont « constitutives » et les réponses différées sont « induites ». Parmi les réponses constitutives, la phagocytose et la mélanisation alors que la production de peptides antimicrobiens, dépendent des voies de signalisation tel que Toll, est considérée comme induite.....29

Figure 12 : Images des hémocytes circulant dans l'hémolymphe larvaire d'*Apis mellifera*. a.) Granulocytes larvaires ; b.) hémocytes correspondant à la description de L5-2 telle que décrite par Negri et al. 2014 ; c.) cellules larvaires perméabilisées ; d.) plasmatocytes et e.) granulocytes provenant de l'hémolymphe d'adulte. Adapté du (Richardson et al., 2018).....30

Figure 13 : Ilya Metchnikov et ses diagrammes de phagocytes bactéries (macrophages et microphages). (Kaufmann, 2008, 2019)34

Figure 14 : schéma de Phagocytose dans la *Drosophile* en illustrant les 4 étapes : 1. reconnaissance des particules, 2. internalisation des particules, 3. formation du phagosome, 4. maturation du phagolysosome et dégradation de particule. (Melcarne et al., 2019).....36

Figure 15 : Les espèces réactives d'oxygène contiennent un électron supplémentaire qui peut réagir avec les composants cellulaires qu'ils soient étrangers ou non. Elles ont une fonction bactéricide intégrale mais crée en même temps un stress oxydatif régulé par les enzymes antioxydantes tel que « Superoxyde dismutase » Source : CC by 4.0 (Racila & Bickenbach, 2009).....37

Figure 16 : La voie Toll est une cascade de signalisation gérée par plusieurs gènes tels que *spaetzle*, *Toll*, *myD88*, *cactus* et *Pelle*, qui codent pour leurs protéines respectives. *Spaetzle* est une protéine extracellulaire qui interagit avec plusieurs PGRP pour identifier les PAMP (peptidoglycane fongique et/ou bactérien), tandis que *Toll* est une protéine intégrée dans la membrane cellulaire et que *myD88*, *cactus* et *pelle* sont des protéines adaptatrices intracellulaires qui propagent le signal en aval, conduisant finalement à la production du peptide antimicrobien *Drosomycine*. Adapté du (Medzhitov, 2001).....40

Figure 17 : Description graphique de l'hypothèse scientifique et du résumé entrepris pour l'étude en question. Certaines réponses immunitaires constitutives et induites ont été étudiées dans des hémocytes d'*Apis mellifera*, de *Bombus terrestris* et de *Drosophila melanogaster*, exposés à des mélanges d'imidaclopride (IMI) et d'acétamipride (ACE) après activation immunitaire avec du peptidoglycane (PGN).46

Figure 18 : cellules de Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*, frais, dans le milieu Schneider sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5mm)47

Figure 19 : (a) cadre de larves de *Apis mellifera* avec des larves du 5^{ème} stade (flèches blanches), (b) larves de *Apis mellifera*, (c) nid de *Bombus terrestris* avec des ouvriers, les cocons nymphes (X) et des larves (flèches blanches) ; image source : Koppert Biological Systems (d) larves de *Bombus terrestris*49

Figure 20 : hémocytes d'*Apis mellifera* après extraction de larves et suspension en milieu WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm)50

Figure 21 : cellules de *Bombus terrestris* après extraction de larves et suspension en milieu de WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm). Marquage avec Trypan Blue afin de mesurer la viabilité : les cellules mortes (flèches bleues) absorbent le colorant bleu Trypan lorsque leurs membranes cellulaires sont rompues, tandis que les cellules vivantes (flèches noires), dont les membranes cellulaires sont intactes, restent incolores/non marquées.54

Figure 22 : cellules de *Bombus terrestris* après extraction de larves et suspension en milieu de WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm) et incubées avec des billes de latex. Ici, la phagocytose est mesurée par la capacité de la cellule à ingérer au moins une bille de latex. Les cellules couvertes de billes, marquées par des flèches noires, sont en train d'ingérer ces billes. Les cellules qui ne sont couvertes d'aucune bille sont marquées par des flèches bleues.56

Figure 23 : **a.** hémocytes de *Drosophila melanogaster* non-marqués (vert-clair) et marqués (vert-foncé) ; **b.** isolation de population de singlets (90.95%) avec « polygon gating » ; **c.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (94.0%) ; **d.** hémocytes de *Apis mellifera* non-marqués (violet-clair) et marqués (violet-foncé) ; **e.** isolation de population de singlets (84.65%) avec « polygon gating » ; **f.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (97.8%) ; **g.** hémocytes de *Bombus terrestris* non-marqués (bleu-clair) et marqués (bleu-foncé) ; **h.** isolation de population de singlets (80.196%) avec « polygon gating » ; **i.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (67.4%)58

Figure 24 : Viabilité (%) des hémocytes de (a.) *Drosophila melanogaster*, (b.) *Apis mellifera* et (c.) *Bombus terrestris* après exposition au peptidoglycane (PGN 0, 1, et 5 $\mu\text{g/ml}$), à l'imidaclopride (I 6 et 48 $\mu\text{g/ml}$) et à l'acétamipride (A 6 et 48 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 heures. Les différences significatives par rapport au contrôle sont indiquées par un astérisque (a. et b. ANOVA, c. Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, $n = 3$).68

Figure 25 : Activité phagocytaire chez *Drosophila melanogaster* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).76

Figure 26 : Activité phagocytaire chez *Apis mellifera* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).78

Figure 27 : Activité phagocytaire chez *Bombus terrestris* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).79

Figure 28 : Production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chez *Drosophila melanogaster* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)84

Figure 29 : Production de peroxyde d'hydrogène chez *Apis mellifera* mesuré après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de

traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).....86

Figure 30 : Production de peroxyde d'hydrogène chez *Bombus terrestris* mesuré après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$).....88

Figure 31 : Production de H_2O_2 chez *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* après traitement avec PGN et exposition aux IMI et ACE. Les groupes de traitement (PGN) significativement différents sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)92

Figure 32 : Expression génétique de (a) spaetzle et (b) myD88 après exposition à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) sans activation immunitaire (0 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane (PGN 0)). Les différences significatives sont indiquées par des lettres (ANOVA, $p > 0,05$; $n = 3$).....94

Figure 33 : Expression génétique de (a) spaetzle et (b) myD88 après exposition à l'imidaclopride et à l'acétamipride avec activation immunitaire (1 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane). Les différences significatives sont indiquées par des lettres (ANOVA, $p > 0,05$; $n = 3$).95

Figure 34 : Expression génétique de (a) spaetzle et (b) myD88 après exposition à l'imidaclopride et à l'acétamipride avec activation immunitaire (5 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane). Les différences significatives sont indiquées par des lettres (ANOVA, $p > 0,05$; $n = 3$).96

Figure 35 : Quantité de l'ARN obtenu de *Bombus terrestris* après traitement avec PGN et les néonicotinoïdes IMI et ACE pendant 18 heures. La quantité obtenue de l'hémolymphé frais et sans traitement (la ligne rouge cassé à 188 $\text{ng}/\mu\text{L}$) était un peu plus haute que le moyen des échantillons traités. La quantité nécessaire est environ 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (la ligne rouge continue)..... 100

LISTE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Plan d'exposition à l'activateur immunitaire et aux pesticides.....	51
Tableau 2 : Voltages de FSC, SSC et BLA-1 utilisés pour le réglage de paramètres de la cytomètre en flux.....	57
Tableau 3 : Liste des amorces de <i>Apis mellifera</i> , <i>Bombus terrestris</i> et <i>Drosophila melanogaster</i> utilisé pour le RT-PCR/qPCR.....	61

LISTE DE ANNEXES

ANNEXE I146

TABLEAU DE CONCENTRATIONS DE DL_{50} DE DIFFERENTES ESPECES

ANNEXE II147

TABLEAU DE COMPOSITION DE MILIEU DE CONGELATION ET DECONGELATION POUR LES CELLULES SCHNEIDER-2 DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

ANNEXE III149

TABLEAU D'ANALYSES STATISTIQUES DE VIABILITE CELLULAIRE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*, *APIS MELLIFERA* ET *BOMBUS TERRESTRIS*

ANNEXE IV150

TABLEAU D'ANALYSES STATISTIQUES DE PHAGOCYTOSE DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*, *APIS MELLIFERA* ET *BOMBUS TERRESTRIS*

ANNEXE V151

TABLEAU D'ANALYSES STATISTIQUES DE LA PRODUCTION DE PEROXYDE D'HYDROGENE (H_2O_2) PAR *DROSOPHILA MELANOGASTER*, *APIS MELLIFERA* ET *BOMBUS TERRESTRIS*

ANNEXE VI152

TABLEAU D'ANALYSE STATISTIQUES DE L'EXPRESSION GENETIQUE DE *SPAETZLE* ET *MYD88* DE L'*APIS MELLIFERA*

LISTE D'ABBREVIATIONS

Abs : Absorbance

ACE : Acétamipride/Acetamiprid

ACh : acétylcholine/acetyl choline

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique/Deoxyribose Nucleic Acid

ADNc/cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire/complementary DNA

ANOVA : Analysis of Variance

ASB/BSA : Albumine sérum bovin/Bovine Serum Albumin

CAT : Catalase

CCD : Colony Collapse Disorder (Syndrome d'effondrement des colonies d'abeille)

CL/LC : Concentration létale/Lethal Concentration

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

Ct : cycle threshold (seuil de cycle)

DAF-FM-DA : Diamino fluorescein-FM diacetate

DAMP : Motif moléculaire associés aux dégâts/Damage-associated Molecular Pattern

DE : Dose avec effet

DL : Dose létale

DMPF : N-(2,4-dimethylphenyl) -N-methylformamidine

DMSO : Diméthylsulfoxyde/Dimethyl Sulfoxide

EFSA : European Food Safety Authority/Autorité européenne de sécurité des aliments

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène/Hydrogen Peroxide

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HRP : Horseradish Peroxidase (Peroxydase de raifort)

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

Imd : Immunodéficienc (voie de signalisation)

IMI : Imidaclopride/Imidacloprid

IPBES : Intergovernmental Science Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services

IUCN : International Union for Conservation of Nature

IUT : Institut Universitaire de Technologie

JAK/STAT : Janus kinase/ transducteur du signal et activateur de transcription

JNK : c-Jun N-terminal kinase

LPS : Lipopolysaccharide

MAMP : Motif moléculaire associés aux microbes/Microbe-associated Molecular Pattern

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nAChR : Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine/Nicotine-acetylcholine Receptors

NAG : N-acetylglucosamine

NAM : N-acetylmuramic acid

NCN : cyanoimine

NIM : Nimrods

NNO₂ : nitroimine

NO : monoxyde d'azote/Nitrogen Oxide

NY : New York

ODD : Objectifs de Développement Durable

ONU/UN : Organisation de Nations Unies/United Nations

PAM/AMP : Peptides antimicrobiens/Antimicrobial Peptides

PAMP : Motif moléculaire associés aux pathogènes/Pathogen-associated Molecular Pattern

PBS : Phosphate Buffer Saline (solution saline tamponnée au Phosphate)

PGN : Peptidoglycane/Peptidoglycan

PGRP : Protéine de reconnaissance des peptidoglycane/Peptidoglycan Recognition Protein

PO : Phenoloxidase

POD : Peroxydases générales

ppb : parts per billion

ppm : parts per million

ProPO : Pro-Phenoloxidase

PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires/Pattern recognition receptors

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction

ROS : Reactive Oxygen Species (Espèces réactives d'oxygène)

SD : Standard Deviation (l'écart-type)

SE : Standard Error (l'erreur standard)

SOD : Superoxyde Dismutase/Superoxide Dismutase

Spz : Spaetzle

SVF/FBS : Sérum veau foetal/Foetal Bovine Serum

TLR : Toll-like receptor

UE : Union Européen

USA : United States of America

USEPA : United States Environmental Protection Agency

USFAO : United States Food and Agricultural Organisation

WWF : World Wildlife Fund



INTRODUCTION GÉNÉRALE



INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'abeille domestique (*Apis mellifera*) et le bourdon terrestre (*Bombus terrestris*) sont souvent considérés comme les fleurons de la communauté des pollinisateurs, responsables de plus de 153 milliards d'euros de services agricoles, assurant jusqu'à 75 % de la sécurité alimentaire mondiale (Allsopp et al., 2008; Gallai et al., 2009). En fait, leurs services de pollinisation vont au-delà de l'agriculture, car elles sont également des piliers essentiels du maintien de la biodiversité mondiale et fournissent les ressources de départ pour plusieurs autres industries économiques : textile, carburant et matériaux de construction, pour n'en citer que quelques-unes. Leur importance, reconnue très tôt par les Mayas et les Aztèques, est encore plus ancrée dans de nombreuses cultures à travers le monde, puisqu'elles font partie des pratiques traditionnelles à travers la production de miel, de propolis et de pain de pollen. C'est en raison de la diversité et de l'unicité de leur niche écologique que leur déclin soudain est une préoccupation majeure (Aizen et al., 2009; Hung et al., 2018; IPBES et al., 2016; Klein et al., 2007).

En 2017, la Plateforme Intergouvernementale Scientifique et Politique sur la Biodiversité et les Services Écosystémiques (IPBES) a identifié un déclin constant des populations d'espèces d'abeilles en Amérique du Nord (-21 %) et en Europe (-21 %), parmi lesquelles le bourdon, peu étudié, et l'abeille domestique. Ce rapport souligne également le manque de données disponibles pour comprendre l'effet des multiples facteurs de changement global sur les pollinisateurs (IPBES et al., 2016).

Les études disponibles ont toutefois permis de dégager une tendance claire, impliquant plusieurs néonicotinoïdes, tels que l'imidaclopride et l'acétamipride et leurs effets létaux et sublétaux, dans le déclin rapide de la diversité des pollinisateurs. À la suite de multiples évaluations des risques, études et examens, ces deux

néonicotinoïdes ont été jugés dangereux pour les abeilles domestiques, les bourdons et d'autres pollinisateurs (Bonmatin et al., 2015; European Food Safety Authority (EFSA), 2008, 2018; Goulson et al., 2015). En 2018, l'UE a interdit l'utilisation de ces néonicotinoïdes dans les champs en plein air et sur les plantes à fleurs afin de protéger les abeilles (Union européenne L132, 2018). Pourtant, la France a approuvé la réintroduction de l'imidaclopride en septembre 2020 pour une période de trois ans (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de la République Française, 2020). Nonobstant l'interdiction de l'UE, les néonicotinoïdes restent les insecticides les plus utilisés à l'échelle mondiale du fait de leur facilité et leur flexibilité d'application, de leurs effets durables dans les tissus végétaux et de leur prix abordable (Bonmatin et al., 2015; Chmiel et al., 2019; Goulson, 2013).

Les stimuli externes tels que les néonicotinoïdes dérèglent un aspect de système immunitaires (un effet indirect ou direct) des insectes. Par conséquent, les impacts synergiques tel que les cocktails des pesticides ou l'effet cumulatif de pesticides et de pathogènes, sur les systèmes immunitaires des pollinisateurs doivent être plus clairement compris afin de promulguer des changements importants dans les politiques environnementales et de garantir que les plantes et les pollinisateurs sont suffisamment et également protégés.

La thèse proposée traitera l'effet cumulatif de l'imidaclopride (IMI) et de l'acétamipride (ACE) sur le système immunitaire de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* afin de comprendre l'effet du pesticide sur la réponse immunitaire de ces organismes. Les deux pesticides seront étudiés sous leurs formes pures, seuls et en cocktail. Le système immunitaire sera stimulé à l'aide de peptidoglycane (PGN) provenant de paroi de *Staphylococcus aureus*. Les hémocytes activées exposées aux pesticides peuvent être utilisées en tant que biomarqueurs. Les paramètres observés comprennent la phagocytose, la mortalité, la production du

peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) une espèce réactive de l'oxygène, et l'expression génétique de *spaetzle* et *myD88* de la voie immunitaire Toll de trois différents organismes mentionnés ci-dessus.



ÉTAT DE L'ART



1 ÉTAT DE L'ART

1.1 Le monde et la biodiversité

Notre monde abrite environ 8,7 millions d'espèces eucaryotes, dont plus de 50 % sont des espèces d'insectes (Mora et al., 2011; Sweetlove, 2011). Ces organismes, ainsi que de nombreuses espèces procaryotes, coexistent au sein d'écosystèmes et de réseaux trophiques, échangent de l'énergie, se développent, se reproduisent et fournissent des services uniques qui font partie intégrante de la vie de la Terre. La « biodiversité » fait référence à ce collectif de vie multiforme qui cohabite au sein de cinq biomes principaux : aquatique, forêt, prairie, désert et toundra (IPBES et al., 2019; IUCN, 2001; WWF et al., 2022).

Sur ces 8,7 millions d'espèces, seuls 1,2 million (15 %) d'eucaryotes ont été identifiés à ce jour (principalement des insectes) et moins encore ont été étudiés en profondeur, laissant les 7,5 millions d'espèces restantes dans l'obscurité (McDaniel et al., 2023; Mora et al., 2011; National Geographic Society, 2022; Sweetlove, 2011). Néanmoins, en 2019, la Plateforme Intergouvernementale Scientifique et Politique sur la Biodiversité et les Services Écosystémiques (IPBES) a estimé notre impact quantifiable sur l'environnement (Figure 1) en identifiant 40 000 espèces menacées d'extinction au cours des prochaines décennies ainsi que la destruction de 10 millions d'hectares de forêts par an, dont 90 % sont dus à l'expansion de l'agriculture (IPBES et al., 2019).

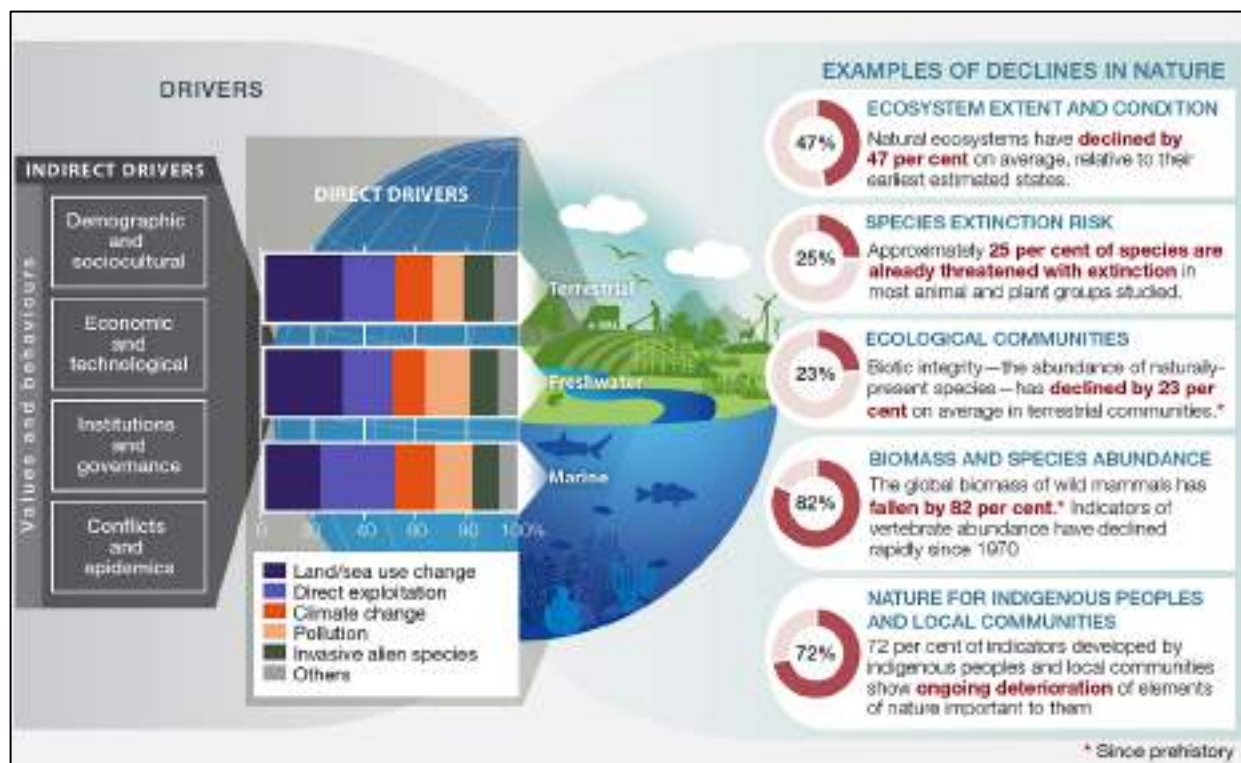


Figure 1 : Les facteurs de changement global, tels que la pollution, la modification de l'utilisation de terre et mer, et le changement climatique, ont entraîné un déclin significatif de la biodiversité dans le monde entier. L'exploitation directe des terres et des mers par l'agriculture et la déforestation, ainsi que les changements dans leurs utilisations, sont considérées comme des facteurs directs découlant de causes géographiques et sociétales, et sont responsables de plus de 50 % de l'impact mondial. Les causes spécifiques de l'impact anthropique comprennent l'utilisation de pesticides et de fertilisants et sont souvent cumulables avec les maladies. (IPBES et al., 2019)

Effectivement, le rapport des Organisation de Nations Unies (ONU) sur les Objectifs de Développement Durable (ODD) en 2019 a précisé que 10 % des 5,5 millions d'espèces d'insectes estimées dans le monde, dont un grand nombre n'ont pas encore été identifiées, sont fortement menacées (United Nations & Jensen, 2019). En plus, une méta-analyse réalisée en 2020 (Figure 2) a révélé une réduction de 8.8 % de la biomasse des insectes terrestres par décennie, depuis 1985 (Van Klink et al., 2020). Parmi les insectes menacés, les pertes considérables de pollinisateurs enregistrées ces dernières années constituent un aspect important de cette préoccupation (Hallmann et al., 2014; IPBES et al., 2016).

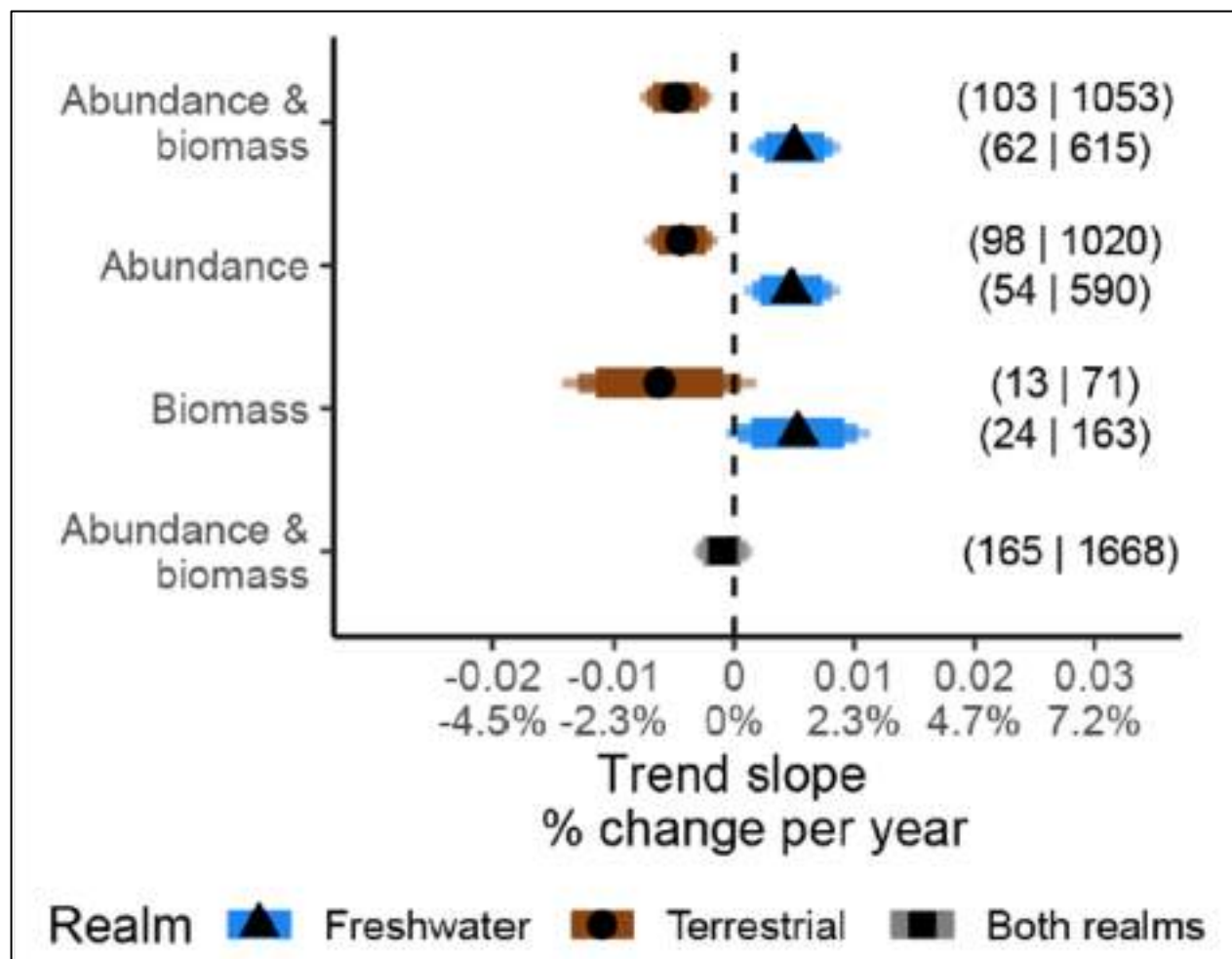


Figure 2 : graphique en forêt illustrant la tendance de l'abondance (abondance) et la biomasse (biomasse) des invertébrés terrestres (brun) et aquatiques (bleu). Une réduction dans les nombres de insectes terrestres (l'abondance et la biomasse) à 0.92% par an (-8.8% par décennie) a été observé. Par contre, il y a avait une augmentation des insectes aquatiques à 1.08% par an (+11.3% par décennie). Chiffres entre parenthèses sont respectivement les nombre d'études et les nombre de sites pour chaque estimation. (Van Klink et al., 2020)

1.1.1 Le déclin des pollinisateurs et ses conséquences

En effet, en 2016, l'IPBES a publié un rapport d'évaluation complet intitulé « Pollinisateurs, pollinisation et production alimentaire » (« Assessment report on pollinators, pollination and food production »). Ce rapport contient plusieurs messages clés concernant la contribution des pollinisateurs et leur déclin actuel. Si les pollinisateurs contribuent à la pollinisation globale, ils jouent également un rôle important dans la propagation du patrimoine et de l'identité culturelle en contribuant à la production d'alimentation, de médicaments, de textiles, de matériaux de

construction et de biocarburants. Leur abondance et leur diversité, bien que peu étudiées et peu signalées, connaissent un déclin rapide, un phénomène qui devrait se poursuivre si des politiques rapides et efficaces respectueuses de l'environnement ne sont pas mises en œuvre au niveau mondial (IPBES et al., 2016).

En fait, les estimations actuelles prévoient que la disparition totale des pollinisateurs entraînerait une diminution de 40 % à 90 % de 28% de la production végétale mondiale et une diminution allant jusqu'à 40 % des 72 % restants (Klein et al., 2007). Bien que toutes les cultures ne dépendent pas de la pollinisation animale, on s'attend à ce qu'une perte importante de pollinisateurs affecte les chaînes trophiques, car les sources de nourriture pour de nombreuses populations animales deviendraient rares ou disparaîtraient complètement. Une diminution aussi importante de la biodiversité végétale et animale aurait une incidence directe sur la sécurité nutritionnelle et alimentaire, qui est directement liée à la santé des populations humaines dans le monde entier (Chaplin-Kramer et al., 2014). L'amoindrissement des ressources alimentaires et des ressources de départ (telles que le coton, la soie, le lin, le bois, le colza, la noix de coco etc.) aurait également un impact sur la valeur économique des cultures. Les prix pour les consommateurs augmenteraient et les marges bénéficiaires réduiraient pour les petites et moyennes entreprises, tout en imposant une charge plus lourde aux producteurs, tels que les agriculteurs et les fabricants, qui doivent constamment répondre à une demande croissante avec des ressources moins nombreuses et plus coûteuses (Gallai et al., 2009; Sumner & Boriss, 2006). Par conséquent, les pertes croissantes de pollinisateurs enregistrées depuis les années 1970 sont extrêmement préoccupantes et mettent en évidence la non-durabilité des gains économiques du marché mondial si la biodiversité environnementale et les pollinisateurs ne sont pas protégés (IPBES et al., 2016).

Les données relatives à la disparition des pollinisateurs et à ses causes sont malheureusement insuffisantes dans de nombreuses régions du monde. Toutefois, lorsque des données sont disponibles, il a été signalé que les abeilles mellifères en particulier ont connu un déclin de la diversité et de l'abondance de leur population en Europe (-21 %) et en Amérique du Nord (-21 %). Les conclusions du rapport de l'IPBES sont étayées par la Liste Rouge (« Red List index ») des espèces menacées publiée par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN) sur de nombreuses espèces de pollinisateurs. Il convient toutefois de noter que depuis 2014, les familles de pollinisateurs *Apidae* et *Bombus* sont largement répertoriées et évaluées comme "données insuffisantes", car elles sont peu étudiées dans les pays autres que l'Europe et l'Amérique du Nord (IUCN, 2023; Nieto et al., 2014). Néanmoins, parmi les facteurs de changement impliqués dans le déclin des pollinisateurs, en particulier des abeilles domestiques et des bourdons, l'utilisation de pesticides et les agents pathogènes figurent au premier plan, de même que la perte d'habitat, le changement d'affectation des terres, la gestion des maladies, les pratiques apicoles préjudiciables, les espèces invasives et le changement climatique (Heinrich-Böll-Stiftung et al., 2022; Nieto et al., 2014). On a également mis en évidence le rôle des menaces multiples et cumulatives qui pèsent sur les abeilles, en particulier celui des agents pathogènes et des pesticides présents dans l'environnement, qui ont un effet cumulatif ou combiné sur la physiologie et la santé des pollinisateurs (Bird et al., 2021; Bonmatin et al., 2015; Goulson et al., 2015; Heinrich-Böll-Stiftung et al., 2022; IPBES et al., 2016; IUCN, 2023).

1.1.2 Les pollinisateurs : gardiens de la sécurité alimentaire

La pollinisation animale se produit lorsqu'un animal, souvent un insecte tel que l'abeille, le bourdon, ou le papillon, transporte le pollen (le gamète sexuel) d'une plante de la partie mâle d'une fleur à la partie femelle de la même fleur ou d'une autre fleur

de la même espèce (Figure 3) (Dobbs, 1750). Cela entraîne la fécondation de la fleur et la production de fruits et de graines, ainsi que la propagation de l'espèce végétale.



Figure 3 : Pollinisation des fleurs avec des insectes. Les insectes pollinisateurs (abeilles, bourdons, papillons) sont bien adaptés pour transférer et déposer les grains de pollen entre les fleurs. Ce transfert et dépôt est fait quand les insectes butinent pour le nectar et autres sources de nutriment. Source : (Dobbs, 1750) source : Encyclopædia Britannica (<https://www.britannica.com/science/pollination#/media/1/467948/148672>)

Sur ce type de pollinisation animale, 35 % sont attribués aux insectes pollinisateurs, domestiqués et sauvages, tels que les abeilles, les bourdons, les coléoptères et les papillons. Les abeilles mellifères de l'Ouest et de l'Est sont de bons exemples de pollinisateurs domestiqués. L'abeille domestique occidentale (*Apis mellifera*), en particulier, a une valeur économique et commerciale ajoutée grâce à sa production de miel. Les pollinisateurs sauvages comprennent les bourdons, les abeilles sans dard, les abeilles solitaires, les papillons et les coléoptères (IPBES et al., 2016).

1.1.2.1 Valeur économique

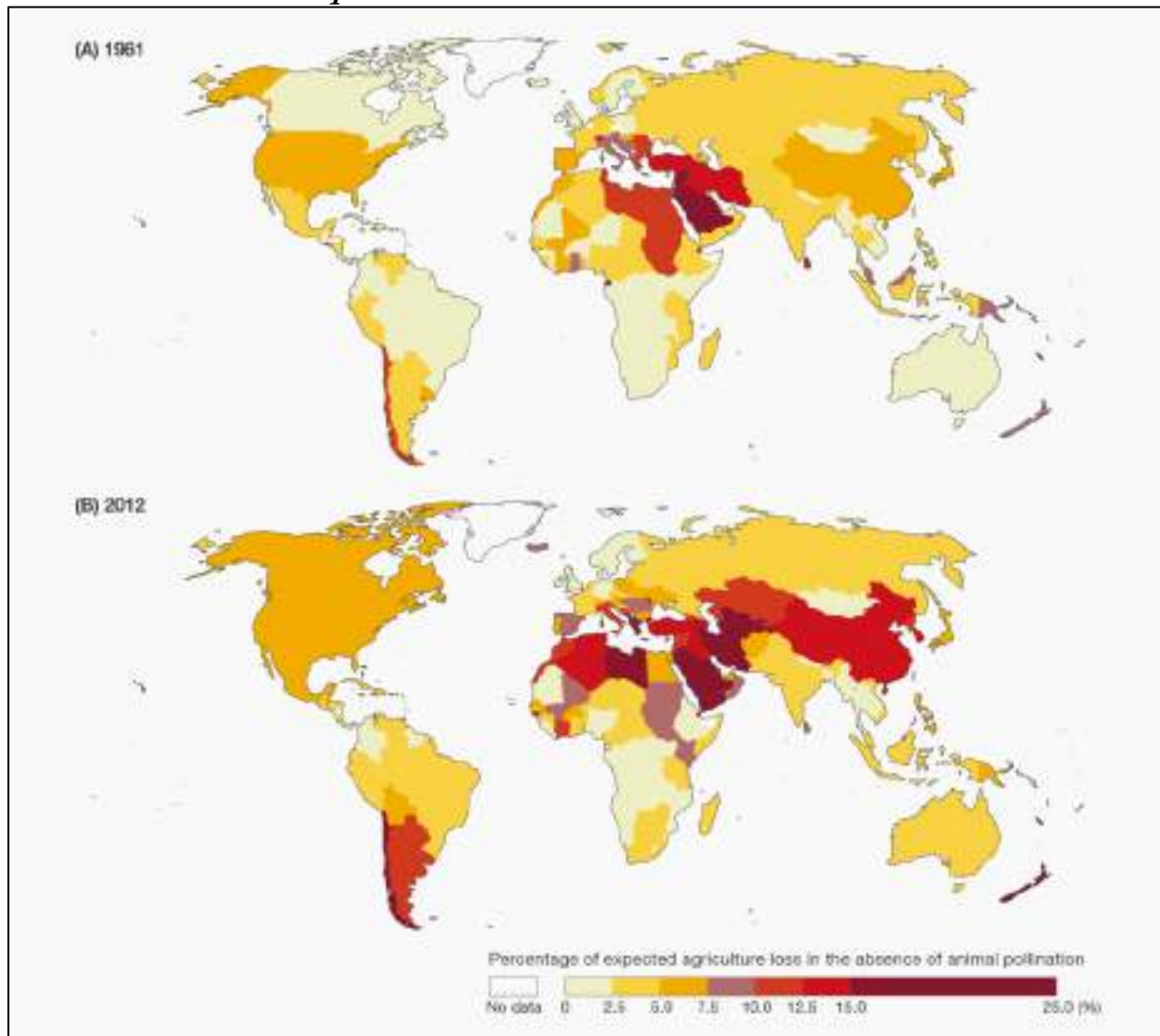


Figure 4 : Carte du monde illustrant la dépendance de l'agriculture mondiale sur la pollinisation en (A) 1961 et (B) 2012, selon les données de FAO. Suivant la méthodologie de Aizen et al. (2009), cette dépendance peut être comparable et liée directement à une réduction d'alimentaire globale en cas de perte de pollinisateurs. (IPBES et al., 2016)

Les insectes pollinisateurs, qu'ils soient sauvages ou gérés, sont directement et indirectement responsables de plus de 75 % de la sécurité alimentaire et nutritionnelle mondiale. En fait, les cultures alimentaires dépendant des pollinisateurs ont augmenté de 300% depuis 1970 et contribuent actuellement à une production alimentaire d'environ 500 milliards de dollars dans le monde, y compris les exportations de cultures (IPBES et al., 2016). En 2008, la contribution des pollinisateurs gérés à la production alimentaire mondiale a été estimée à 95,7 millions d'euros (122,8 millions

de dollars), tandis que les services des pollinisateurs sauvages ont contribué à hauteur de 242,5 millions d'euros (310,9 millions de dollars) à la production alimentaire humaine mondiale par an (Allsopp et al., 2008). Une étude réalisée en 2009 a en outre estimé la valeur économique totale des services de pollinisation par les insectes à 153 milliards d'euros (Gallai et al., 2009). Bien qu'il soit difficile d'estimer les services rendus par les pollinisateurs, l'étude indique que la disparition des pollinisateurs pourrait avoir un impact sur au moins 9,5 % de la production agricole mondiale (Figure 4), car les insectes pollinisateurs sont directement responsables de la production de 46 cultures destinées à l'alimentation humaine (Gallai et al., 2009).

1.1.2.2 La famille Apidae

L'abeille domestique, également connue sous le nom d'abeille occidentale, *Apis mellifera*, (Figure 5a.) est l'espèce d'abeille la plus connue de la famille Apidae. Au sein de cette famille, on trouve également le bourdon *Bombus terrestris* (Figure 5b.).



Figure 5 : macrophoto de **a.** *Apis mellifera* (source : Lightcubex/Flickr) et **b.** *Bombus terrestris* (source : Helen M Bushe/Flickr) en train de butiner

La famille Apidae constitue la plus grande famille de l'ordre des Hyménoptères (Figure 6) et contiennent au moins 25000 espèces d'abeilles connues (Chadwick et al., 2021). Toutes les espèces d'abeilles sont d'excellents pollinisateurs en raison de leur structure physique : leur corps poilus piègent et transportent le pollen d'une fleur à

l'autre lorsqu'elles butinent le nectar : une seule abeille peut visiter jusqu'à 2 000 fleurs par jour, ce qui souligne leur efficacité et leur importance pour la pollinisation (Chadwick et al., 2021). Outre leurs impressionnantes capacités de pollinisation, les abeilles mellifères (*Apis mellifera*) produisent du miel en excès, ce qui leur a valu d'être domestiquées et commercialisées par l'homme au cours des derniers siècles (Hung et al., 2018; Klein et al., 2007).

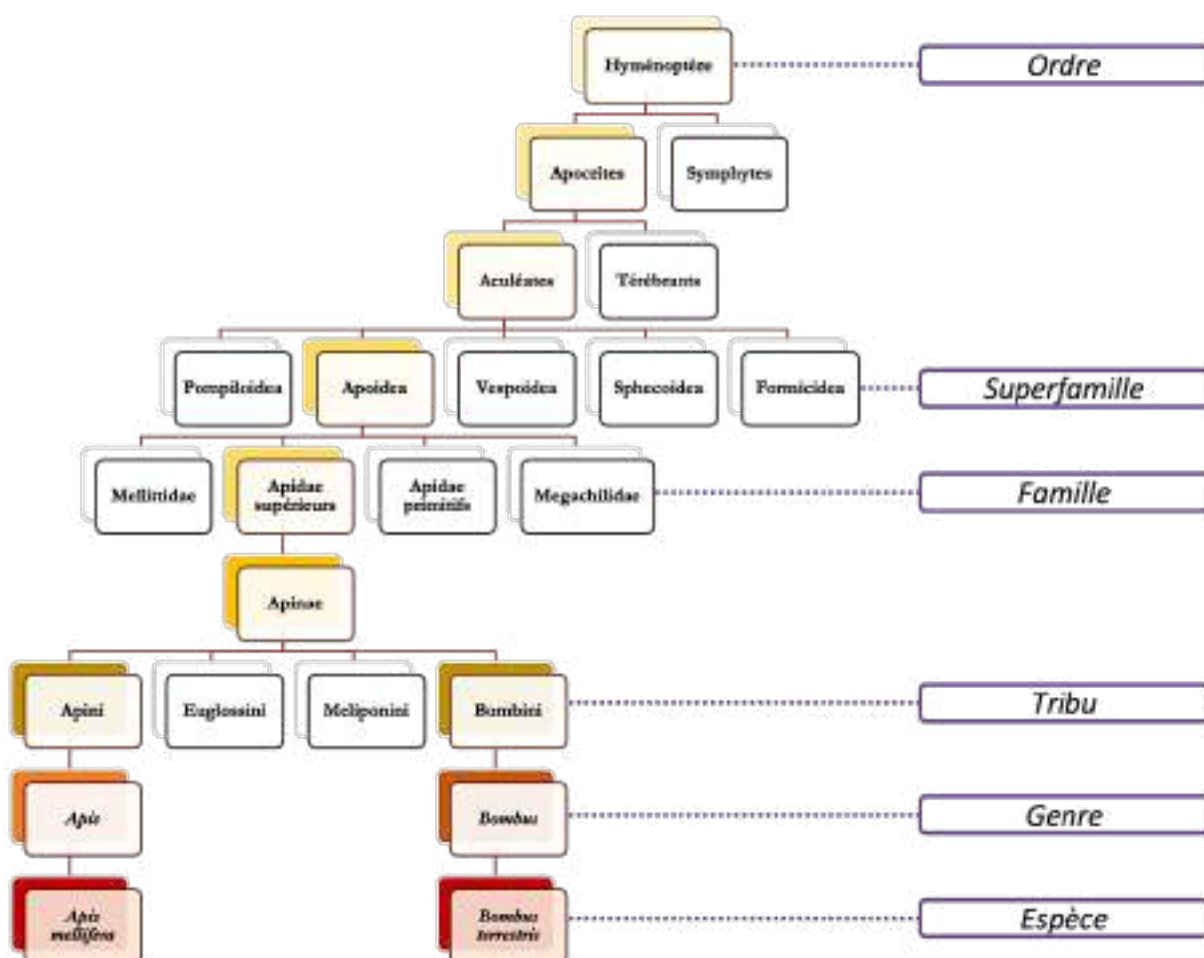


Figure 6 : classification taxonomique de l'*Apis mellifera* et du *Bombus terrestris* dans l'ordre Hyménoptère

1.1.2.2.1 *Apis mellifera*

Structurellement, *Apis mellifera* est rapidement identifiable grâce à son corps jaune et noir ressemblant à du velours (Figure 5a.). Les adultes mesurent 15 mm et possèdent deux yeux aux environ 150 facettes chacun, et trois ocelles, ce qui leur permet de

détecter avec précision des fleurs de différents types, même par temps nuageux. Le thorax, couvert de petits filaments, est idéal pour piéger et transporter le pollen. Il abrite aussi deux paires d'ailes en chitine, ainsi que les muscles, les ligaments nécessaires au vol et 3 paires de pattes dont les pattes antérieures équipées de poils rigides pour peigner le pollen lors de la recherche de nourriture et les pattes postérieures velues dotées de paniers pour faciliter le transport du pollen. (Figure 5). Les femelles sont aussi équipées d'un dard à l'apex de l'abdomen.

Les abeilles mellifères sont des insectes extrêmement sociaux et vivent donc dans des ruches régies par une structure hiérarchique rigide : un grand nombre d'abeilles ouvrières assurent l'alimentation des larves, la production de miel et régulent la température de la ruche. Un petit nombre de faux-bourçons mâles fécondent les reines qui fonderont d'autres colonies. Une reine est responsable de la ponte des œufs fécondés de la colonie. Une seule colonie peut ainsi compter jusqu'à 80.000 individus, tous chargés de maintenir la colonie en vie. Par conséquent, les abeilles dépendent fortement de l'immunité sociale pour maintenir une ruche en bonne santé et assurer leur survie, en particulier celle de la reine (Chadwick et al., 2021; Hung et al., 2018).

1.1.2.2.2 *Bombus terrestris*

Les *Bombus terrestris*, bien que semblables à leurs cousines productrices de miel en termes de couleur, de motif et de structure générale, sont beaucoup plus grands - ils mesurent jusqu'à 17 mm -, beaucoup plus ronds et beaucoup plus poilus (Figure 5b.) (Chadwick et al., 2021; Goulson, 2010). Bien que les bourçons ne représentent qu'environ 1 % de la famille Apidae, ils sont des pollinisateurs très importants dans le monde et, à certains égards, plus efficaces que l'abeille domestique. Cela s'explique en partie par le fait que l'espèce n'a pas été domestiquée et que les nids de bourçons peuvent encore se former et survivre dans la nature, contrairement aux abeilles domestiques (Goulson, 2010). Ces nids sont toutefois beaucoup plus petits et souvent

enfouis dans le sol. Ils sont « primitivement eusociaux », car la division du travail est moins spécialisée que chez *Apis mellifera* et la structure hiérarchique à l'intérieur des nids est beaucoup moins stricte. Ceci est principalement dû au fait qu'il n'y a pas de différence morphologique entre les bourdons ouvriers et les bourdons reines, si ce n'est la taille (la reine étant plus grande). De plus, contrairement aux abeilles domestiques, les nids de bourdons ne survivent pas à l'hiver. La plupart des ouvrières périssent et la reine, qui s'est assurée que ses œufs ont été fécondés pendant les mois d'été, entre en hibernation. Elle réapparaît au début du printemps et initie un nouveau nid en pondant de nouveaux œufs (Goulson, 2010).

1.1.3 La pollution environnementale

Les nombreuses perturbations environnementales contemporaines sont fréquemment liées à une augmentation de l'utilisation des pesticides, dont les néonicotinoïdes qui ont gagnés en notoriété au cours de ces trois dernières décennies. (Bonmatin et al., 2015 ; Matsuda et al., 2001).

1.1.3.1 Les pesticides

Un 'Pesticide' est défini par la Commission européenne comme tout produit chimique ou micro-organisme qui « prévient, détruit ou contrôle un organisme nuisible – 'ravageur', ou une maladie » (Commission européenne, 2020) et par l'Organisation des États-Unis pour l'Alimentation et l'Agriculture (USFAO) comme « tout mélange de substances d'origine chimique ou biologique destiné à repousser, détruire ou contrôler tout ravageur ou à réguler la croissance des plantes » (USFAO, 2017). Les pesticides, également identifié comme des « produits phytopharmaceutiques » (PPP), sont classés en fonction de (i) leur structure chimique comme les néonicotinoïdes ainsi nommés en raison de leur similitude chimique avec la nicotine (Figure 7a.), (ii) leur utilisation, c'est-à-dire les herbicides, les fongicides, les insecticides, (iii) leur toxicité (USEPA

2020), ou (iv) le risque qu'il représentent pour l'environnement (Commission européenne, 2020).

Les pesticides sont composés d'une ou plusieurs substances actives et de plusieurs ingrédients inertes ou « co-formulant », ce qui permet d'obtenir une formulation commercialisable. Alors que la substance active est le produit chimique primaire qui cible le ravageur et protège la plante ou le bétail sur lequel il est appliqué, les ingrédients inertes ou « co-formulant » soutiennent la substance active et augmentent son efficacité et son utilité - souvent en augmentant la persistance, la viscosité et la performance globale du produit (Bonmatin et al., 2015). Il est important de noter qu'un ingrédient inerte n'est pas nécessairement « non toxique ». La formulation chimique constitue le produit mis sous différents noms commerciaux (Commission européenne, 2020 ; USEPA 2020 ; FAO 2017). Le produit commercial peut prendre plusieurs formes en fonction de son mode d'application : poudre d'enrobage pour les semences, poudre mouillable ou liquide pour les pulvérisations ou injections (Bonmatin et al. 2015, Commission européenne 2020 ; USEPA 2020 ; FAO 2017).

1.1.3.1.1 Imidaclopride et acétamipride

Lancé en 1991 par Bayer CropScience, l'imidaclopride (IMI) et l'acétamipride (ACE) sont deux insecticides systémiques à chloronicotinyle qui font partie d'une petite classe de seulement sept pesticides appelés « néonicotinoïdes » (Bonmatin et al., 2015; Mason et al., 2013). Les autres composés de cette classe sont le clothianidine, le nitenpyram, la nithiazine, le thiaclopride et le thiaméthoxame (Bonmatin et al., 2015). L'imidaclopride a été le premier introduit dans l'agriculture, d'abord aux États-Unis, puis en France et dans le reste de l'Europe en 1994. En 2012, 75 % de l'utilisation mondiale des néonicotinoïdes était basée en Amérique latine, en Asie et en Amérique du Nord ; tandis que 11 % des ventes mondiales étaient comptabilisées en Europe (Bass et al., 2015). À cette époque, l'imidaclopride, ainsi que deux autres

néonicotinoïdes, le clothianidine et le thiaméthoxame, représentaient environ 85 % des ventes mondiales (Bass et al., 2015) bien qu'à ce moment-là, les néonicotinoïdes, l'imidaclopride en particulier, sont suspectés d'être liés au syndrome d'effondrement des colonies (« Colony Collapse Disorder », CCD), qui a atteint un pic en 2006 aux États-Unis (Mason et al., 2013).

1.1.3.1.1 Caractérisation

L'imidaclopride ($C_9H_{10}ClN_5O_2$ - Figure 7b.) est un nitroimine, aromatique et hétéromonocyclique, avec un point de fusion de 142°C et un poids moléculaire de 255,66 g/mol (Simon-Delso et al., 2015; Tomizawa et al., 1995). Il est soluble dans l'eau à hauteur de 0,6 g/L à 20°C à pH 7 (Bonmatin et al., 2015). Son hydrosolubilité en fait un produit avec une activité systémique élevée et le rend rapidement absorbable par les tissus végétaux : tige, feuilles, fleurs, pollen et nectar (Casida, 2018; Chmiel et al., 2019; Simon-Delso et al., 2015).

En outre, avec une persistance de 191 jours dans les sols riches en minéraux ou acides contenant beaucoup de matière organique et de 129 jours dans les systèmes eau-sédiments en raison d'un potentiel d'adsorption élevé, il est considéré de manière controversée comme idéal pour le « trempage de semences » à fin d'établir un contrôle prolongé des ravageurs (Motaung, 2020). Il est souvent vendu sous forme de poussières/poudres, de sprays, de liquides et de concentrés qui peuvent être utilisées pour le traitement des semences, ainsi que pour les applications foliaires et au sol (Bonmatin et al., 2015; Goulson, 2013; Simon-Delso et al., 2015).

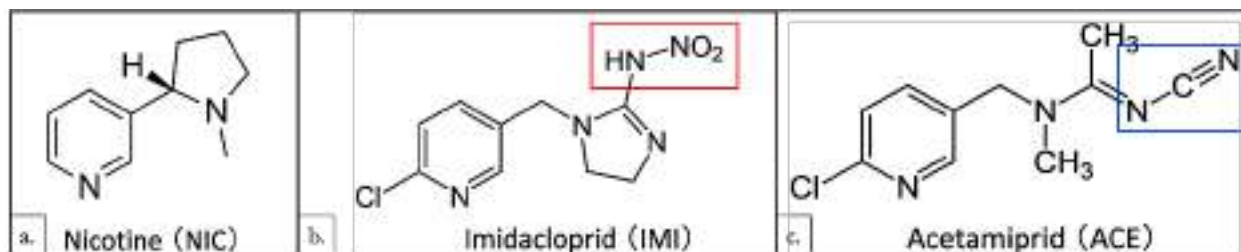


Figure 7 : Structure chimique de **a.** nicotine, **b.** imidaclopride avec le groupe nitroimine (rouge) est donc « nitrosubstitué » et **c.** acétamipride avec le groupe cyanoimine (bleu) est donc « cyanosubstitué ». Image modifié du (Nakayama et al., 2019)

En revanche, l'acétamipride (Figure 7c.), bien que similaire à l'imidaclopride dans sa structure chimique et ses propriétés physiques, possède un groupe actif différent : un cyanoimine. Son hydrosolubilité de 4,25 g/L à 25°C est idéale pour une application foliaire ou au sol en forme de sprays aériens (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002). C'est un composé hydrosoluble fortement mobile qui peut facilement contaminer les eaux de surface. L'acétamipride ne peut pas être facilement dégradé dans les sols ou dans l'eau car son hydrolyse et sa photolyse sont faibles. Sa persistance, et celle de ses métabolites, est donc assez forte dans l'environnement surtout aux températures ambiantes (22°C et 35°C). À sa sortie en 2002 aux Etats-Unis, il était référencé comme un insecticide moyennement toxique pour les abeilles et autres invertébrés non-ciblés (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002). Il existe de nombreuses variétés commerciales des matières actives actuellement sur le marché : Confidor, Gaucho, Premier, Premise, Admire, Provado, Marathon pour l'imidaclopride et ArVida, Omni Brand Aceta, Tristar, Argyle, Anarchy, Liberty Aceta-Bif pour l'acétamipride (USEPA, PIP Extonet, 2020 ; PubChem, 2020).

L'Agence de Protection de l'Environnement aux Etats-Unis (USEPA) et l'Union Européen (UE) les classent comme des agents toxiques de classe II (moyennement toxique) et de classe III (légèrement toxique) (Figure 8) bien qu'ils soient destinés à un

usage général (European Food Safety Authority (EFSA), 2008, 2018; United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002, 2002).

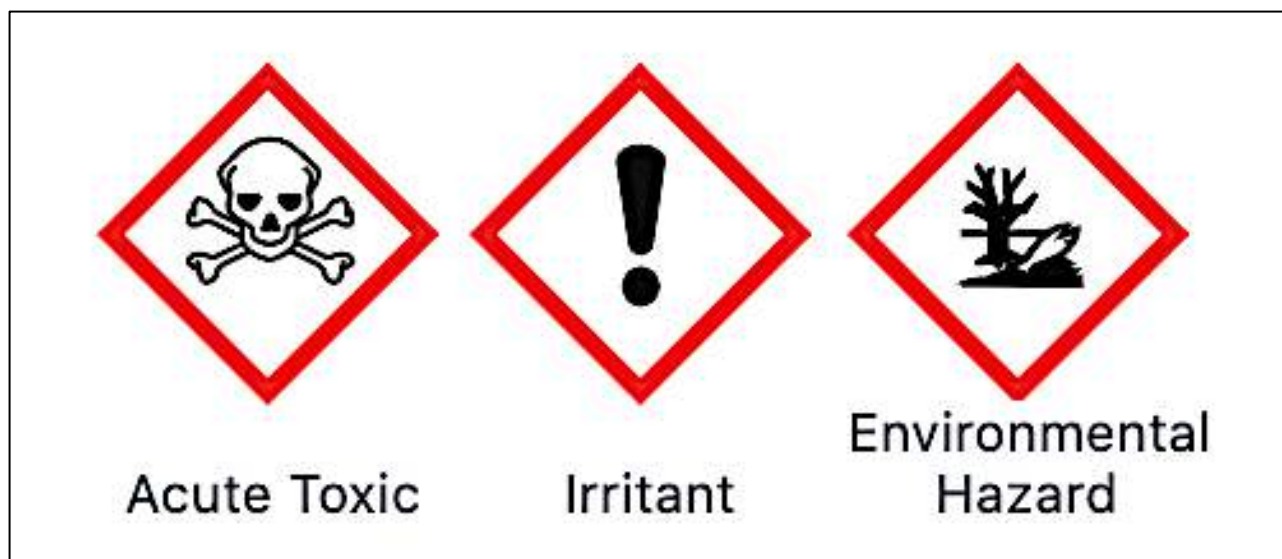


Figure 8 : Panneau d'avertissement pour l'Imidaclopride et l'acétamipride (United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002)

1.1.3.1.1.2 Toxicité

L'imidaclopride et l'acétamipride sont des insecticides dont la structure chimique est similaire à celle de la nicotine (Figure 7) et qui ciblent le système nerveux des insectes en bloquant les récepteurs nicotine-acétylcholine post-synaptiques (nAChR), ce qui entraîne une accumulation du neurotransmetteur acétylcholine (ACh) (Casida, 2018; Mason et al., 2013; Tennekes, 2010; Tomizawa et al., 1995; Tomizawa & Casida, 2001). Indépendamment de leur différence (l'imidaclopride classée comme une nitroimine (NNO_2), son homologue l'acétamipride est une cyanoimine (NCN)), les deux composés remplacent l'ACh sur les sites agonistes des nAChRs (Casida, 2018; Tomizawa et al., 1995; Tomizawa & Casida, 2001). À faibles doses, les néonicotinoïdes induisent une interruption des fonctions physiologiques normales et une paralysie qui, à des expositions plus élevées et aiguës ou faibles mais chroniques, peuvent conduire à la mort des sujets exposés (Goulson, 2013; Mason et al., 2013; Matsuda et al., 2001; Simon-Delso et al., 2015; Tennekes, 2010).

L'utilisation de l'imidaclopride et de l'acétamipride est controversée depuis sa mise en vente aux États-Unis dans les années 1990. À l'époque, il était indiqué qu'il était moins toxique pour les mammifères que pour les insectes (Cimino et al., 2017; United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002). Cependant, entre 1994 et 2010, plusieurs études ont démontré les effets sublétaux et létaux de l'imidaclopride, de l'acétamipride et de ses métabolites (Mason et al., 2013; Suchail et al., 2004; Tennekes, 2010). En effet, en 2003, le ministère français de l'Agriculture a commandé une étude sur les abeilles domestiques concernant les effets du « Gaucho », une de forme commerciale de l'imidaclopride. Cette étude a montré que, lorsqu'il était utilisé comme enrobage de semences sur le tournesol et le maïs, « Gaucho » présentait un risque léthal pour les abeilles domestiques aux différents stades de leur vie ainsi qu'une mortalité accrue chez les abeilles nourricières (Comité scientifique et technique de l'étude multifactorielle des troubles des abeilles, 2003).

De multiples études indépendantes au cours des deux décennies suivantes dont celles de Goulson (2013) et celle de Mason et al. (2013) ont aussi conclu que l'imidaclopride et l'acétamipride, ainsi que leurs métabolites, peuvent être considérablement toxiques pour les insectes, les oiseaux, les amphibiens, les chauves-souris et même les humains, même à des niveaux réalistes sur le terrain (Goulson, 2013; Mason et al., 2013).

Gibbons et al. (2015) indiquent que l'USEPA avait déjà constaté une augmentation des tumeurs cancéreuses du foie chez les souris stimulées par l'imidaclopride (Cimino et al., 2017; Gibbons et al., 2015). La toxicité aigüe de l'imidaclopride est considérée comme modérée pour les mammifères tels que les rats et les souris ($DL_{50} = 131-475$ mg/kg) et comme modérément à hautement toxique pour diverses espèces d'oiseaux ($DL_{50} = 25-483$ mg/kg) (Gibbons et al., 2015). L'examen complet des effets toxiques de l'imidaclopride et d'autres néonicotinoïdes sur la faune mondiale par (Mason et al., 2013) relate plusieurs études montrant leurs effets létaux et non létaux

sur les poissons, les amphibiens, les abeilles, les chauves-souris et les humains à des concentrations réalistes sur le terrain (Mason et al., 2013). Ainsi, l'imidaclopride perturbe le système d'écholocation des chauves-souris insectivores (C.-H. Wu et al., 2020), altère les populations locales d'oiseaux aux Pays-Bas exposées aux eaux de surfaces contaminées concentrations de plus de 20 ng/L d'imidaclopride (diminution moyenne de 3,5 % par an) (Hallmann et al., 2014) et affecte les amphibiens tels que les têtards et les grenouilles (Davidson et al., 2002; Mason et al., 2013).

Ces études ont également suspecté un lien potentiel entre le phénomène d'affaiblissement des populations d'abeilles (CCD) et l'utilisation de ces deux pesticides sur des champs ouverts de tournesol et de maïs (Bonmatin et al., 2015; Mason et al., 2013). Employés sur les champs de maïs, de betteraves et de tournesols, les néonicotinoïdes contaminent les insectes pollinisateurs tels que les abeilles domestiques, les bourdons, les papillons, les coléoptères et les guêpes par le nectar et le pollen qu'ils transportent jusqu'à la ruche (Figure 9) (Bonmatin et al., 2015; Free et al., 1975; Krupke et al., 2012; Mason et al., 2013). Des résidus de pesticides sont mesurés dans les ruches, le pollen, le pain de pollen, le nectar et même le miel (Bonmatin et al., 2015).

La DL_{50} moyenne de l'imidaclopride (IMI) et de l'acétamipride (ACE) est respectivement de 18 μg et de 8100 μg par abeille en administration orale (Casida, 2018). En exposition chronique, la DL_{50} de l'IMI pour les abeilles domestiques a été mesurée à 1 pg/jour dans les 10 jours (Suchail et al., 2001). Suchail et al. ont également pris en compte l'impact des produits métabolisés de l'IMI et de leur accumulation après ingestion, envisageant la possibilité d'une « toxicité différée ou retardée », (Suchail et al., 2004). Iwasa et al. ont observé une DL_{50} de 18 ng/abeille pour l'IMI et de 7000 ng/abeille pour l'ACE, ce veut dire que l'imidaclopride en tant

que composé nitrosubstitué s'avère trois cents fois plus létal que l'acétamipride qui est cyanosubstitué (Iwasa et al., 2004).

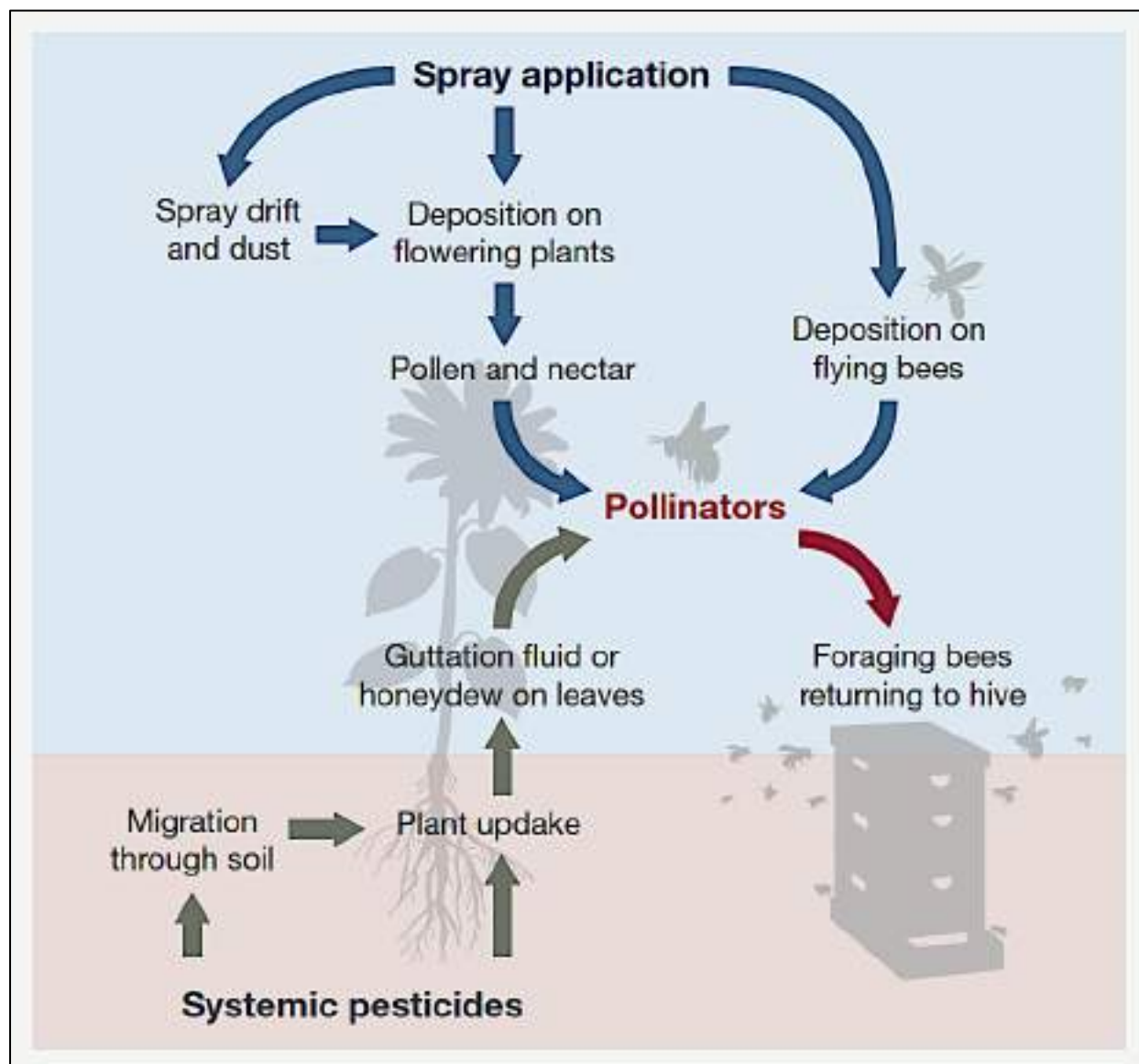


Figure 9 : voies d'expositions aux pesticides systémiques vis-à-vis les abeilles mellifères. (IPBES et al., 2016)

Les effets de l'ACE démontrés chez les abeilles mellifères incluent une entrave à la mémoire à long terme et à la fonction locomotrice à des doses sublétales de 0,1 et 0,5 µg/abeille, ainsi qu'une perte des fonctions immunitaires et de détoxification chez les abeilles ouvrières adultes et une perturbation du développement des larves suite à des

expositions chroniques de 5mg/L (El Hassani et al., 2008; Laurino et al., 2011; Pereira et al., 2020; Pisa et al., 2015; Shi et al., 2020).

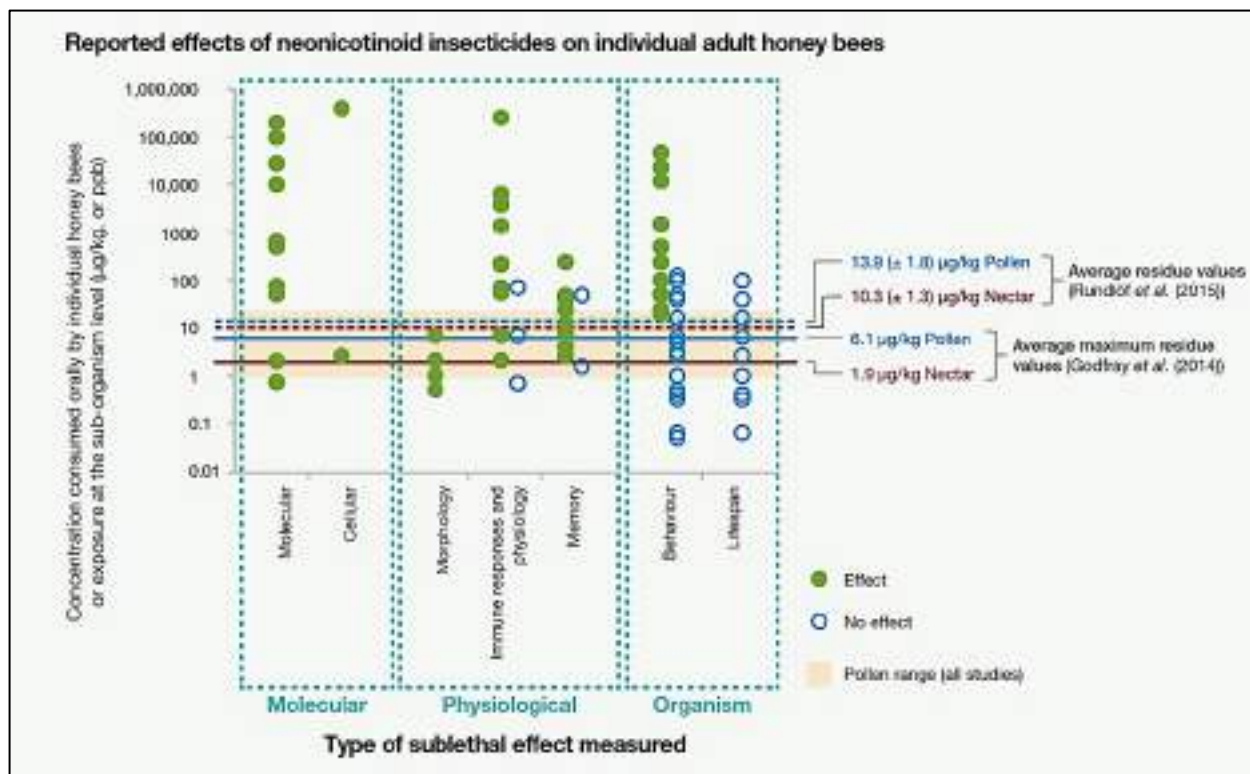


Figure 10 : Effets sublétaux de néonicotinoïdes chez les abeilles mellifères aux trois niveaux d'études : moléculaire, physiologiques, organisme. (IPBES et al., 2016)

Plusieurs effets sublétaux ont été mis en évidence chez les abeilles mellifères et les bourdons (Figure 10), à savoir une perturbation de la dynamique et de l'endurance de vol, un retard dans le comportement de butinage et d'apprentissage (Mason et al., 2013; Tennekes, 2010 ; Feltham et al., 2014; Kenna et al., 2019; Muth & Leonard, 2019), une diminution significative de l'immunocompétence et une altération de la fonction hématocytaire chez les abeilles domestiques et d'autres pollinisateurs (Brandt et al., 2016; Pamminer et al., 2018) ainsi que la possibilité d'affecter les voies de signalisation immunitaire et d'autres réponses immunitaires fondamentales des insectes (James & Xu, 2012) après une exposition à l'imidaclopride. En effet, les hématocytes, possédant des nAChRs, sont également sensibles à l'action de

l'imidaclopride et de l'acétamipride et peuvent être altérés dans leur fonction (Matsuda et al., 2001; Pamminger et al., 2018). Il est donc important de comprendre l'effet de ces néonicotinoïdes sur la qualité des réponses immunitaires montées par les abeilles domestiques ainsi que les bourdons.

1.2 IMMUNOLOGIE

L'immunité peut se définir comme un système de défense organisé qui protège un organisme contre les agents infectieux tels que les pathogènes (bactérie, fungi et virus) ou encore les agents biotiques et abiotiques (la changement de température ou les particules étrangères) (Elrod-Erickson et al., 2000; Kaufmann, 2008, 2019; Mechnikov, 1908).

1.2.1 Le système immunitaire : complexe et interconnecté

En général, il existe deux types d'immunité : **l'immunité innée** et **l'immunité acquise** (Lavine & Strand, 2002). Elles sont souvent associées dans les organismes pluricellulaires. L'immunité innée est conçue pour reconnaître et tuer les envahisseurs (Lavine & Strand, 2002; Vasselon & Detmers, 2002) tandis que l'immunité acquise est chargée de veiller à ce que les infections ultérieures soient annulées plus rapidement et avec une plus grande efficacité en établissant une mémoire immunitaire (Lavine & Strand, 2002).

Les insectes, dépourvus d'une véritable immunité acquise, s'appuient sur un système immunitaire inné primordial et complexe. Ce système comprend **l'immunité humorale** et **l'immunité cellulaire** (Figure 11) qui sont hautement interconnectées et coordonnées. En effet, l'immunité humorale est constituée de molécules circulant dans l'hémolymphe qui sont produites par les hémocytes de l'immunité cellulaire (Elrod-Erickson et al., 2000; Feldhaar & Gross, 2008; Lavine & Strand, 2002). Chez plupart des insectes, l'hémolymphe remplit la totalité de la cavité corporelle de

l'organisme, appelée "hémocoèle", en raison de la présence d'un système circulatoire ouvert (Myllymäki & Rämet, 2014).

Les membranes des hémocytes contiennent des « récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires » (PRR ou « Pattern Recognition Receptors »). Ils sont capables de se lier aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP ou « Pathogen Associated Molecular Patterns ») situés à la surface des substances étrangères (Feldhaar & Gross, 2008). Les PAMP, tels que des fragments de parois cellulaires pathogènes dont les peptidoglycanes (PGN), les « lipoteichoic » acides (LTA) ou même les lipopolysaccharides (LPS), sont alors les éliciteurs immunitaires (Feldhaar & Gross, 2008; T.-I. Kim & Kim, 2005; Melcarne et al., 2019).

1.2.2 Les réponses immunitaires

Les réponses immunitaires cellulaires contre les corps étrangers peuvent être catégorisé soit en **immunité constitutive** ou **immunité induite** (Figure 11). L'immunité constitutive se compose de la phagocytose et de l'encapsulation (réponses à médiation hémocytaire) (Malagoli et al., 2017), de la lyse, de la mélanisation et la cascade de phenoloxidase (Boots & Best, 2018). La production de peptides antimicrobiens (PAM) circulant dans l'hémolymph ainsi que la production de espèces réactives d'oxygène (ROS) font partie de l'immunité induite (Boots & Best, 2018; Hillyer, 2016; Lavine & Strand, 2002). Ce dernier est primitif et bien conservé chez tous les eucaryotes dans le processus évolutif, y compris les insectes. Il consiste en de multiples voies de signalisation complexes telles que la voie de signalisation Toll, la voie Imd et la voie JAK/STAT, principalement déclenchées par des infections bactériennes et fongiques et régies par des cascades de gènes (Myllymäki & Rämet, 2014; Valanne et al., 2011).

En plus de leurs effets antibactériens et antifongiques, les PAM sont également capables d'aider à réguler la coagulation et la mélanisation de l'hémolymphe et de produire des espèces intermédiaires réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxyde d'azote (NO) qui contribuent à la réponse immunitaire (Horng & Medzhitov, 2001; Kanost et al., 2004; Valanne et al., 2011).

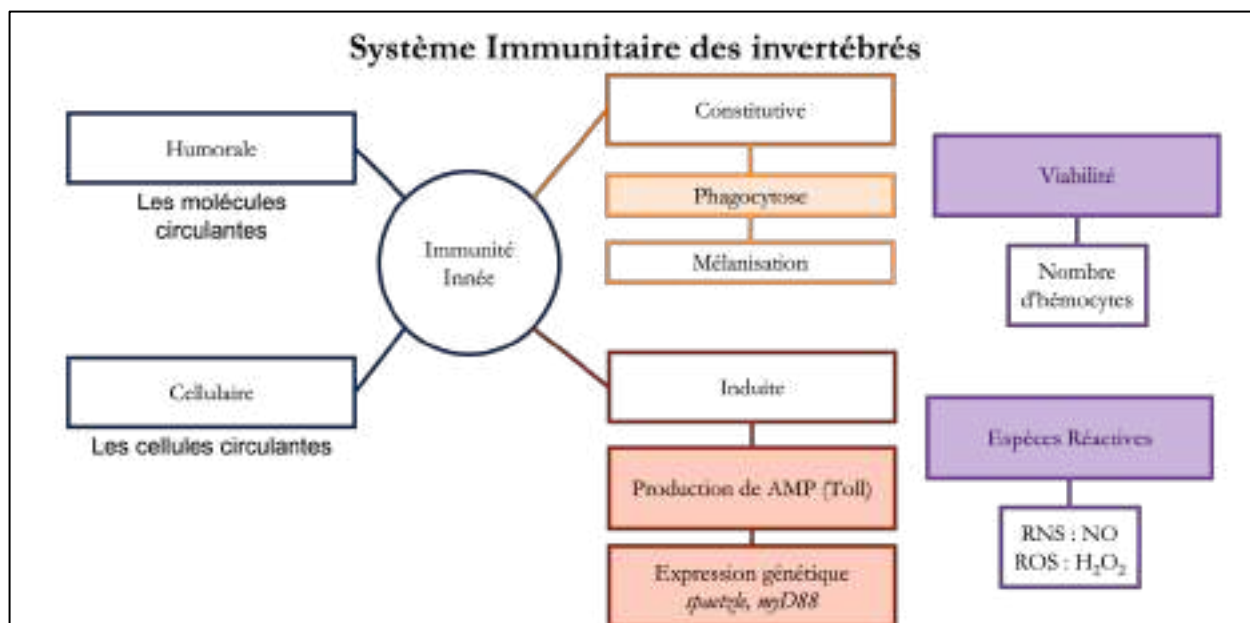


Figure 11 : Les deux bras fonctionnels sont l'immunité Humorale, qui consiste en les molécules circulantes et l'immunité Cellulaire qui en compose des cellules circulantes tels que les hémocytes. Ce système, activé par des pathogènes qui contiennent des activateurs immunitaires, peut être aussi décrit en termes de sa réactivité : les réponses immédiates sont « constitutives » et les réponses différées sont « induites ». Parmi les réponses constitutives, la phagocytose et la mélanisation alors que la production de peptides antimicrobiens, dépendent des voies de signalisation tel que Toll, est considérée comme induite.

1.2.2.1 Classification des hémocytes

La classification des hémocytes d'insectes est basée sur leur morphologie, leur fonction et leur histochimie, bien que la terminologie utilisée pour les identifier soit souvent variée, diffère d'une espèce à l'autre et selon les différents stades de vie de l'insecte (Lavine & Strand, 2002; Moyetta et al., 2021; Parsons & Foley, 2016; Richardson et al., 2018). Le profilage des hémocytes, via des techniques telles que la cytométrie de flux, a permis d'identifier cinq types communs à la plupart des espèces d'insectes, y compris les hyménoptères, les diptères et les lépidoptères : les

prohémocytes, les plasmatocytes, les granulocytes, les spherulocytes et les oenocytoids (Figure 12). Ces types de cellules sont présents aux différents stades du cycle de vie des insectes, mais on pense qu'ils sont plus importants au stade larvaire (Lavine & Strand, 2002; Ribeiro & Brehélin, 2006).

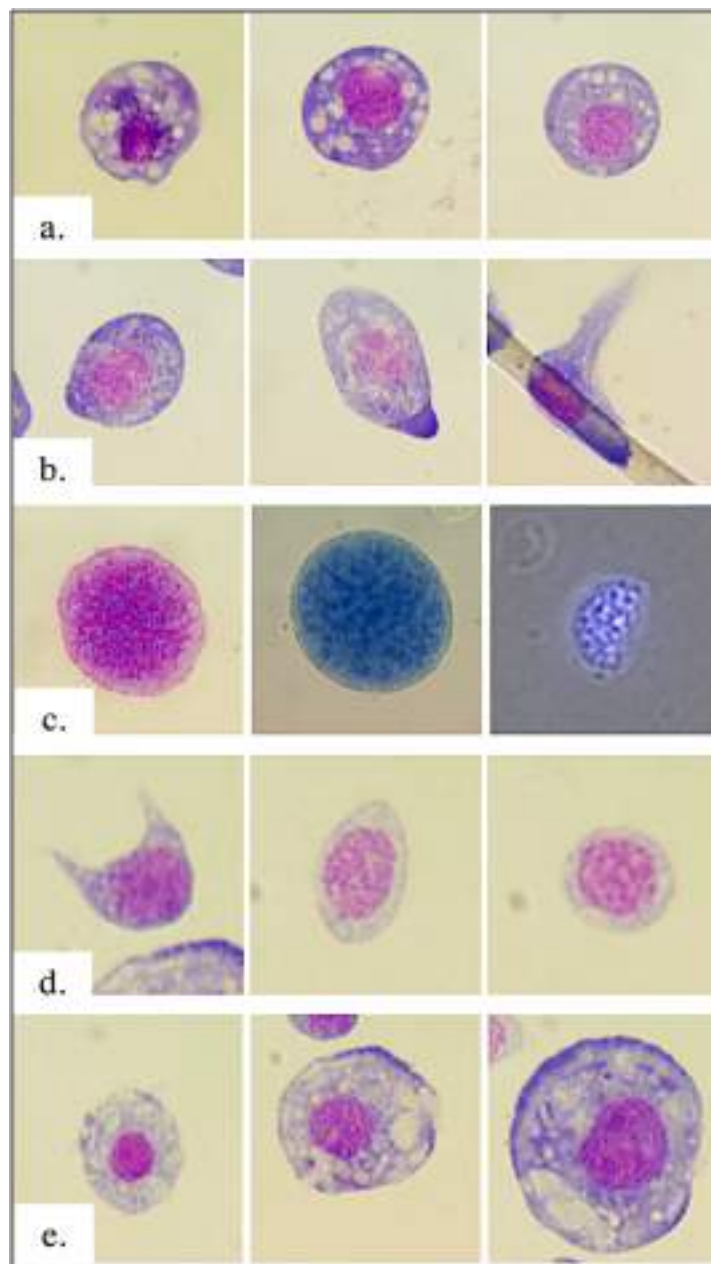


Figure 12 : Images des hémocytes circulant dans l'hémolymphe larvaire d'*Apis mellifera*. a.) Granulocytes larvaires ; b.) hémocytes correspondant à la description de L5-2 telle que décrite par Negri et al. 2014 ; c.) cellules larvaires perméabilisées ; d.) plasmatocytes et e.) granulocytes provenant de l'hémolymphe d'adulte. Adapté du (Richardson et al., 2018)

Chez les insectes, l'hématopoïèse débute au cours de l'embryogenèse et se poursuit lors de la maturation de l'embryon en larve (Lavine & Strand, 2002). Au cours des stades larvaire et nymphal, les **prohémocytes**, cellules souches hémocytaire des organes hématopoïétiques, se divisent pour donner naissance aux hémocytes susmentionnés ; ils se différencient d'abord en **plasmacytes** qui entrent dans la circulation hémolympatique et se différencient ensuite en **granulocytes**, **spherulocytes** ou **oenocytoids** (Parsons & Foley, 2016; Ribeiro & Brehélin, 2006; Richardson et al., 2018).

Les **plasmacytes** sont le type d'hémocyte le plus abondant chez la plupart des insectes, représentant environ 95 % de l'hémolymphe chez *Drosophila melanogaster* et plus de 50 % de l'hémolymphe chez les Lépidoptères (Figure 12d.) (Lavine & Strand, 2002; Ribeiro & Brehélin, 2006). Structurellement, ils sont petits, mesurant jusqu'à 10 µm de diamètre seulement, mais ils sont capables d'étendre des protubérances appelées filopodes qui peuvent s'attacher à des pathogènes invasifs, les englober et les digérer, et sécréter des peptides de défense immunitaire. Ainsi, chez la plupart des espèces d'insectes, les plasmacytes sont des phagocytes professionnels et sont également connus pour participer à la cicatrisation des plaies et à la formation de caillots. En outre, ils jouent un rôle structurel important dans le développement de l'embryon (Lavine & Strand, 2002; Parsons & Foley, 2016).

Chez *Drosophila melanogaster*, trois sous-ensembles d'hémocytes ont été identifiés : les plasmacytes, les cellules cristallines et les lamellocytes. Ici, les **plasmacytes** sont des phagocytes fonctionnels mais peuvent également produire des peptides antimicrobiens, participer à la cicatrisation, à la formation de caillots, à la nodulation et à l'encapsulation (Gábor et al., 2017). Les **cellules cristallines** sont impliquées dans la mélanisation et la cascade de la phenoloxidase. Les homologues de ces cellules chez les Lépidoptères ont été identifiés comme des oenocytoids. Les **lamellocytes**

sont moins étudiés mais on pense qu'ils sont impliqués dans les infections parasitaires et ce, principalement chez les larves (Gábor et al., 2017; Parsons & Foley, 2016).

Il est intéressant de noter que chez les espèces d'Hyménoptères telles que *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*, les **plasmacytes** n'ont pas été facilement observés chez les larves, bien qu'ils constituent jusqu'à 85 % de l'hémolymphe adulte (Figure 12d.) (Marringa et al., 2014; Richardson et al., 2018). Les plasmacytes sont de petites cellules caractérisées par un grand noyau et une forme asymétrique lorsqu'elles sont attachées à des surfaces lisses. Outre cette différence d'abondance entre les espèces, les plasmacytes ne sont pas les principaux macrophages chez les abeilles. Ce rôle est plutôt assumé par les **granulocytes**, qui sont beaucoup plus nombreux chez les larves (jusqu'à 60 % de l'hémolymphe) (Figure 12a.) que chez les adultes (~6-9 % de l'hémolymphe) (Figure 12e.) (Gábor et al., 2017; Marringa et al., 2014; Richardson et al., 2018). Les granulocytes de l'abeille domestique sont de grandes cellules arrondies contenant de multiples vacuoles et sont en grande partie responsables de la phagocytose, de l'encapsulation et de la nodulation, en particulier chez les larves. Ils peuvent également jouer un rôle dans la production de ROS et de RNS, le plus souvent associés à la phagocytose chez de nombreuses espèces d'insectes et de mammifères (Richardson et al., 2018).

L'hémolymphe de l'abeille mellifère contient également des **cellules perméabilisées**, probablement dérivées de granulocytes, qui peuvent être impliquées dans la mort cellulaire programmée et la nécrose (Figure 12c.) (Marringa et al., 2014) ainsi que des **oenocytoids**, de grandes cellules sphériques contenant de la phenoloxidase et de la pro-phenoloxidase endogènes, des composants importants de la mélanisation de l'hémolymphe et de la coagulation sanguine (Gábor et al., 2017; Richardson et al., 2018). Enfin, un type d'hémocyte beaucoup moins étudié, caractérisé chez les larves de cinquième stade, est l'hémocyte **L5-2** (Figure 12b.). Ces cellules sont peu

abondantes et présentent une ressemblance morphologique avec les granulocytes et les plasmotocytes, car elles contiennent de grands mononuclée et sont également capables de s'attacher de manière asymétrique aux surfaces lisses ainsi qu'aux débris cellulaires flottant librement (Negri et al., 2014; Richardson et al., 2018).

1.2.3 La phagocytose

La phagocytose est une réponse immunitaire importante de la médiation cellulaire qui a été caractérisée pour la première fois en 1883 par Ilya Ilitch Metchnikov (1845-1916) (Figure 13) (Mechnikov, 1908). Ses expériences ont permis de décrire les phagocytes et leur fonction ainsi que de faire la distinction entre les macrophages et les microphages (Figure 13) (Kaufmann, 2008; Mechnikov, 1908). Depuis, le processus de phagocytose a été étudié et décrit en détail chez les vertébrés et les invertébrés.

La phagocytose peut être décrite en quatre étapes principales (Figure 14) : 1. reconnaissance des particules, 2. internalisation des particules, 3. formation du phagosome, 4. maturation du phagolysosome et dégradation de particules (Melcarne et al., 2019; Nazario-Toole & Wu, 2017; Rosales & Uribe-Querol, 2017). Lorsqu'un organisme est infecté par des particules étrangères d'une taille supérieure à 0,5 μm , comme les bactéries et les champignons, des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR) à la surface des hémocytes circulants reconnaissent et se lient aux motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) situés à la surface de ces substances étrangères (**reconnaissance des pathogènes**) (Fu & Harrison, 2021; Melcarne et al., 2019; Rosales & Uribe-Querol, 2017).

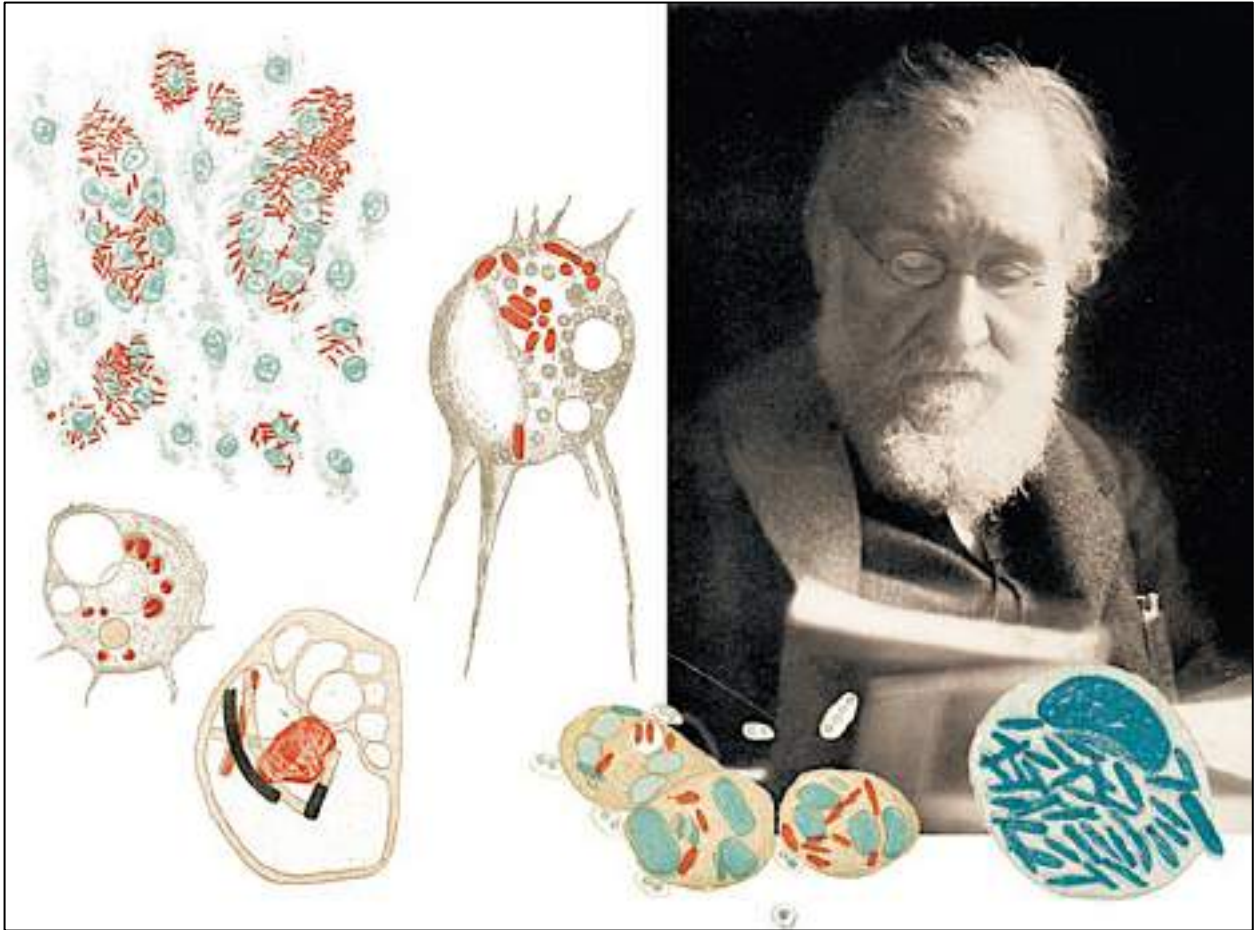


Figure 13 : Ilya Metchnikov et ses diagrammes de phagocytes bactériens (macrophages et microphages). (Kaufmann, 2008, 2019)

L'association PRR-PAMP déclenche une voie de signalisation qui remodèle le cytosquelette d'actine et la membrane lipidique, permettant à l'hémocyte d'étendre sa membrane autour de la particule étrangère, formant des pseudopodes (**internalisation de la particule**), emprisonnant ainsi la particule étrangère dans des organites naissants appelés phagosomes (**formation du phagosome**) (Melcarne et al., 2019; Nazario-Toole & Wu, 2017; Rosales & Uribe-Querol, 2017; Yutin et al., 2009).

Les phagosomes subissent un processus de maturation au cours de l'internalisation des particules. Les premiers stades impliquent la fusion des phagosomes avec les vésicules endosomales précoces, suivie par le développement de corps multivésiculaires (MVB) au sein de ces organites. Ces phagosomes à un stade avancé

fusionnent ensuite avec des lysosomes contenant des enzymes antimicrobiennes (**maturation des phagolysosomes et dégradation de particule**). Les phagolysosomes dégradent ensuite les particules englouties, nettoyant ainsi l'hémolymphe (Melcarne et al., 2019; Nazario-Toole & Wu, 2017; Rosales & Uribe-Querol, 2017; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Les PRR impliqués dans la phagocytose peuvent être « opsoniques » ou « non opsoniques ». Les récepteurs « non-opsoniques » sont capables d'identifier directement les PAMP et d'induire la phagocytose en cas d'infection. Quelques récepteurs important dans cette catégorie font parties de « superfamilles » tant que les Protéines de Reconnaissance du Peptidoglycane (PGRP) , les récepteurs de type Toll (TLR), les récepteurs « Scavenger » (SR) et les Nimrods (Fu & Harrison, 2021; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Les récepteurs opsoniques sont ceux qui sont uniquement capables de reconnaître des molécules spéciales appelées « opsonines » déposées à la surface des particules envahissantes. Ce type de « marquage » est souvent effectué chez les vertébrés par des anticorps tels que les Immunoglobulines (comme *IgG*), la fibronectine, la globuline grasse du lait, le complément, etc. et sont reconnus par leurs récepteurs spécialisés respectifs (Fu & Harrison, 2021; Nazario-Toole & Wu, 2017; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

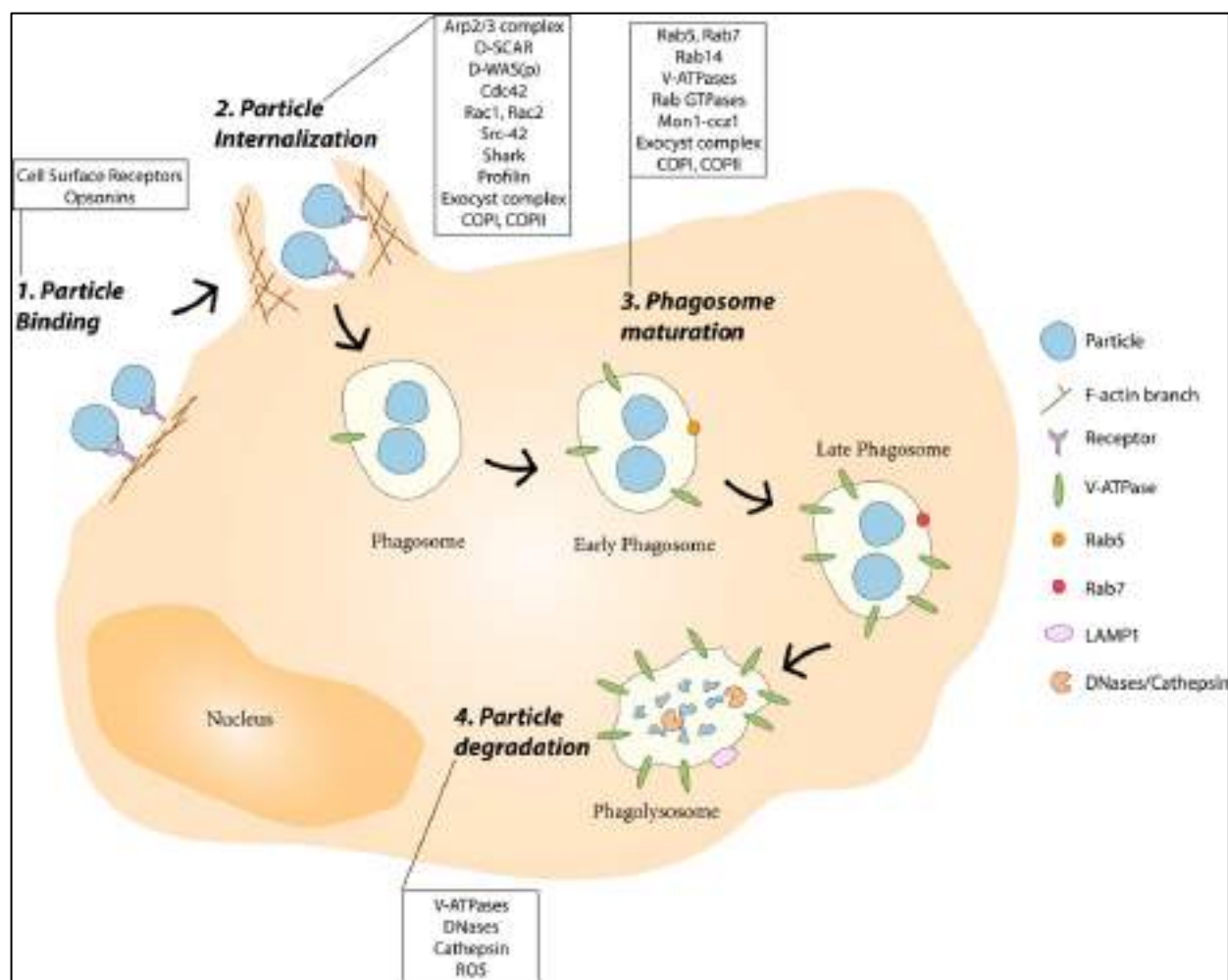


Figure 14 : schéma de Phagocytose dans la Drosophile en illustrant les 4 étapes : 1. reconnaissance des particules, 2. internalisation des particules, 3. formation du phagosome, 4. maturation du phagolysosome et dégradation de particule. (Melcarne et al., 2019)

1.2.4 Les Espèces Réactives d'Oxygène : ROS

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des dérivés très volatils de l'oxygène moléculaire (O_2) produits par l'activité métabolique au cours de divers processus physiologiques (Eleftherianos et al., 2021; Sies & Jones, 2020). Ils sont considérés comme "hautement réactifs" car ils contiennent un ou plusieurs électrons non appariés et sont donc capables d'induire des dommages oxydatifs cellulaires et tissulaires (Bayr, 2005). Les ROS sont par exemple des radicaux libres d'oxygènes tels que le superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle ($OH^\cdot$), le peroxyde ($RO_2^\cdot$) et l'hydroperoxyde ($HO_2^\cdot$) et des molécules oxydantes non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène

(H_2O_2), l'ozone (O_3) et l'acide hypochloreux (HOCl) (Figure 15) (Bayr, 2005; W. Li & Zhang, 2022).

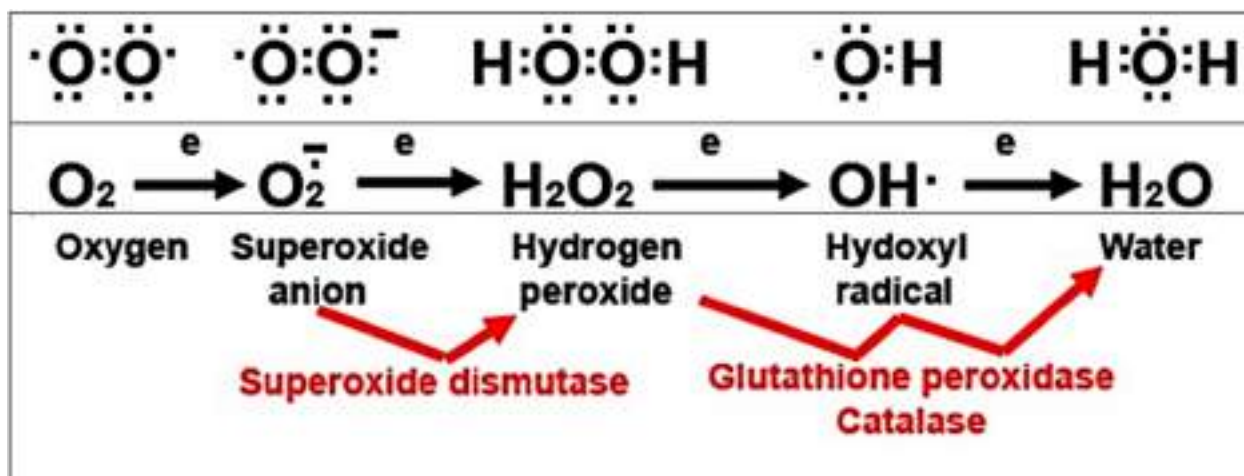


Figure 15 : Les espèces réactives d'oxygène contiennent un électron supplémentaire qui peut réagir avec les composants cellulaires qu'ils soient étrangers ou non. Elles ont une fonction bactéricide intégrale mais créent en même temps un stress oxydatif régulé par les enzymes antioxydantes telles que « Superoxyde dismutase ». Source : CC by 4.0 (Racila & Bickenbach, 2009)

Bien qu'ils soient principalement produits en tant que sous-produits intra- ou extra-cellulaires, et initialement considérés comme toxiques, les ROS jouent finalement un rôle important dans la lutte contre les infections bactériennes, la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la transduction des signaux cellulaires, l'expression des gènes, la phagocytose et d'autres réactions métaboliques. Toutefois, en raison de cette même nature volatile, la surproduction de ces agents entraîne inévitablement des dommages collatéraux et inutiles aux cellules et tissus sains, ce que l'on appelle le "stress oxydatif" (W. Li & Zhang, 2022). La régulation de la production de ROS est donc tout aussi importante pour les cellules et est assurée par des piègeurs de radicaux libres circulants tels que les antioxydants et les enzymes oxydantes.

La production de ROS commence par la réduction incomplète de O_2 univalent en superoxyde anionique $\text{O}_2^{\cdot-}$ par des enzymes fournissant des électrons telles que les oxydases doubles (voie DUOX), la xanthine oxydase (XO), le cytochrome P450 oxydase ou la NADPH oxydase (Eleftherianos et al., 2021). L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ subit une

dismutation, soit spontanément dans des conditions de faible pH, soit via un processus en aval impliquant l'enzyme Superoxyde Dismutase (SOD). La SOD est notamment utile pour éliminer l'excès d' O_2^- et produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Bayr, 2005; Das & Roychoudhury, 2014; Eleftherianos et al., 2021). Bien qu'il ne s'agisse pas d'un agent oxydant puissant en soi en raison de l'absence d'électrons non appariés, H_2O_2 peut se décomposer pour former des radicaux hydroxyles hautement réactifs qui peuvent alors oxyder les acides nucléiques, les lipides, les protéines et d'autres composants cellulaires importants qu'ils rencontrent, provoquant des lésions tissulaires et la mort cellulaire. Parallèlement, H_2O_2 peut également traverser les membranes cellulaires via les aquaporines, participer à la signalisation métabolique cellulaire et jouer un rôle clé dans l'élimination des agents pathogènes en compromettant l'intégrité structurelle des membranes bactériennes. Ces activités rendent donc la molécule utile à des concentrations faibles et contrôlées (Das & Roychoudhury, 2014; Eleftherianos et al., 2021).

La régulation de l' H_2O_2 est assurée par plusieurs systèmes à l'intérieur de la cellule (Bayr, 2005; Eleftherianos et al., 2021). Les antioxydants atténuent le stress oxydatif par des réactions enzymatiques ou non en neutralisant les électrons non appariés présents dans les radicaux libres ou en décomposant les molécules non radicalaires telles que H_2O_2 en eau et en oxygène (Das & Roychoudhury, 2014; Felton & Summers, 1995). L'excès de H_2O_2 peut être hydrolysé en H_2O et O_2 inoffensifs en présence de catalase (CAT). L'activité catalytique de la SOD mentionnée précédemment est également impliquée dans l'élimination des radicaux libres et est cruciale pour la détoxification, tout comme l'activité de la NADPH-quinone oxydoréductase, des peroxydases générales (POD), de la glutathion transférase et de la glutathion réductase (Felton & Summers, 1995; Ray et al., 2012). Les antioxydants non-enzymatiques des insectes sont hydrosolubles ou liposolubles : ascorbate,

caroténoïdes, tocophérols, glutathion. Ils participent chacun à des voies spécifiques responsables de l'élimination des ROS (Felton & Summers, 1995).

1.2.5 L'expression génétique : voie Toll

La voie Toll (Figure 16) est une voie de signalisation clé de la réponse immunitaire induite déclenchée par une infection liée à des bactéries Gram-positives ou à une infection fongique (Hillyer, 2016; Valanne et al., 2011; Vasselon & Detmers, 2002). Elle est aussi la première réponse immunitaire majeure activée lors de la réparation des blessures et des dommages tissulaires (Carvalho et al. 2014). Son mode d'action entraîne la constitution et la contraction d'un "anneau" cytosquelettique qui ferme la plaie (Carvalho et al., 2014).

La voie Toll est guidée par l'expression séquentielle et complexe de gènes tels que *spatzle*, *Toll*, *myD88*, *Tube* et *Pelle*. Ces gènes sont codés, transcrits et aboutissent à la production de protéines qui donnent finalement un complément de peptides antimicrobiens tels que la défensine, l'apidaecine et l'hyménoptaecine (Evans et al., 2006; Feldhaar & Gross, 2008; T.-I. Kim & Kim, 2005; Valanne et al., 2011).

Le gène *spatzle* produit Spaetzle, une protéine qui est presque toujours présente et latente dans la cellule. Elle circule dans l'hémolymphe sous forme de pro-Spaetzle, qui est clivée en sa forme active et se lie au récepteur Toll (Petronio Petronio et al., 2022; Valanne et al., 2011; Weber et al., 2003).

Le récepteur Toll est activé lorsque le Spaetzle subit une protéolyse et se lie au récepteur Toll. (Carvalho et al., 2014). Ensuite, *myD88*, qui code pour la protéine adaptatrice intracellulaire « Myeloid-differentiation factor 88 » (MyD88), est transcrit.

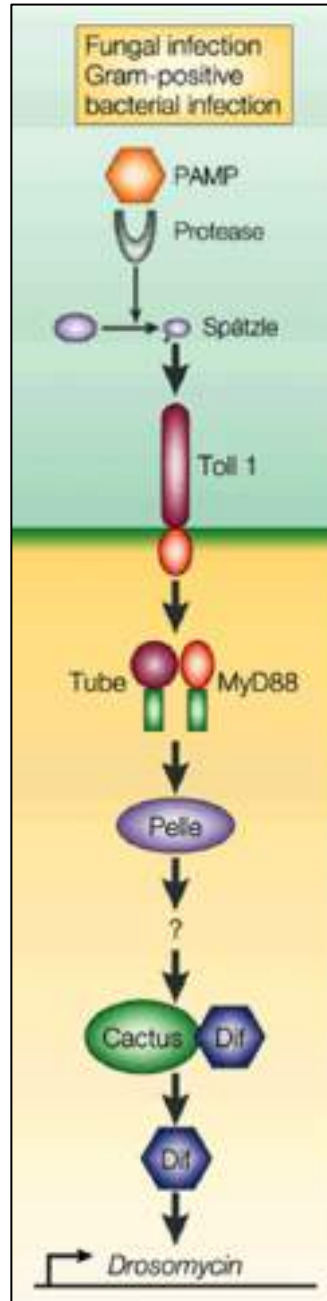


Figure 16 : La voie Toll est une cascade de signalisation gérée par plusieurs gènes tels que *spätzle*, *Toll*, *myD88*, *cactus* et *Pelle*, qui codent pour leurs protéines respectives. Spätzle est une protéine extracellulaire qui interagit avec plusieurs PGRP pour identifier les PAMP (peptidoglycane fongique et/ou bactérien), tandis que Toll est une protéine intégrée dans la membrane cellulaire et que myD88, cactus et pelle sont des protéines adaptatrices intracellulaires qui propagent le signal en aval, conduisant finalement à la production du peptide antimicrobien Drosomycine. Adapté du (Medzhitov, 2001)

Le domaine de mort de la protéine MyD88 interagit avec les domaines de mort de Tube et Pelle (des kinases protéines adaptatrices), formant un complexe, MyD88-Tube-Pelle, qui phosphoryle Pelle et Cactus (Horng & Medzhitov, 2001). Il est

important de noter que MyD88 et Pelle n'interagissent pas entre elles (Carvalho et al., 2014; Deguine & Barton, 2014; Hillyer, 2016; Valanne et al., 2011; Vasselon & Detmers, 2002).

La signalisation de Toll procède à la phosphorylation et à la dégradation de Cactus. La phosphorylation de Cactus est réalisée par l'activité de Pelle. Par la suite, l'un des deux facteurs de transcription, Dif ou Dorsal, est libéré pour une translocation nucléaire, ce qui conduit finalement à l'expression des gènes effecteurs immunitaires et des PAM (Horng & Medzhitov, 2001; Lindsay & Wasserman, 2014; Lord et al., 1990; Valanne et al., 2011).

1.3 Objectif

En 2017, l'IPBES a fait état d'une diminution de 21 % des populations d'abeilles en Amérique du Nord et en Europe. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme des facteurs de changement pour de multiples communautés d'insectes : l'utilisation de pesticides, le changement d'affectation des terres et la perte d'habitat, le changement climatique et les agents pathogènes tels que les bactéries, les virus et les champignons (IPBES et al., 2016). En particulier, les néonicotinoïdes, des pesticides systémiques utilisés depuis les années 1990, ont été fortement liés à la réduction et la disparition des populations d'abeilles sauvages et gérées, telles que l'abeille domestique *Apis mellifera* et le bourdon sauvage *Bombus terrestris* (Goulson et al., 2015). Tout en reconnaissant que les données disponibles sur de nombreuses espèces d'abeilles sont très insuffisantes, le rapport de l'IPBES préconise davantage d'études scientifiques et de meilleures politiques environnementales concernant l'impact écotoxicologiques de ces pesticides sur les populations de pollinisateurs dans le monde entier (Goulson, 2013; IPBES et al., 2016).

Les néonicotinoïdes ont été conçus pour cibler le système neuronal des insectes en bloquant les récepteurs de la nicotine-acétylcholine, ce qui entraîne la paralysie et la mort (Simon-Delso et al., 2015) ; toutefois, leurs effets ont été observés sur plusieurs autres systèmes, à savoir les systèmes immunitaire et reproducteur, et chez nombreux insectes non ciblés appartenant aux ordres des hyménoptères, des lépidoptères et des diptères. Il a été démontré que le comportement d'apprentissage, la capacité de vol, la fécondité et les réponses immunitaires étaient largement compromis par des expositions diverses aux pesticides : exposition aiguë ou chronique, doses pertinentes pour l'environnement et expositions à des mélanges (Abbo et al., 2017; Aliouane et al., 2009; Bird et al., 2021; Brandt et al., 2016; El Hassani et al., 2008; Feltham et al., 2014; Kenna et al., 2019; Mengoni Goñalons & Farina, 2015; Muth & Leonard, 2019; Reid

et al., 2020). Néanmoins, il reste des lacunes cruciales dans les connaissances actuelles, notamment en ce qui concerne l'impact cumulatif des agents pathogènes et des mélanges de pesticides sur la réponse immunitaire. Ces lacunes dans les données ont rendu difficile la compréhension des effets globaux des néonicotinoïdes sur le système immunitaire de pollinisateurs essentiels comme *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*, mais aussi la conception et l'application de politiques environnementales appropriées (IPBES et al., 2016, 2019; WWF et al., 2022).

Cette thèse vise à combler l'une de ces lacunes en identifiant l'impact des mélanges de deux néonicotinoïdes, l'imidaclopride (IMI) et l'acétamipride (ACE), sur la qualité de la réponse immunitaire chez *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster*, un système modèle d'insectes, à la suite de l'activation immunitaire par le peptidoglycane (PGN) de la bactérie gram-positif *Staphylococcus aureus*. L'étude porte sur la viabilité cellulaire après une exposition aux pesticides-pathogènes, ainsi que sur la qualité de la phagocytose, la production de peroxyde d'hydrogène et l'expression génétique de *spatzle* et *myD88*, deux gènes impliqués dans la voie Toll, qui est responsable de la production de peptides antimicrobiens (PAM).



MATÉRIELS & MÉTHODES



2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Démarche scientifique : synthèse graphique

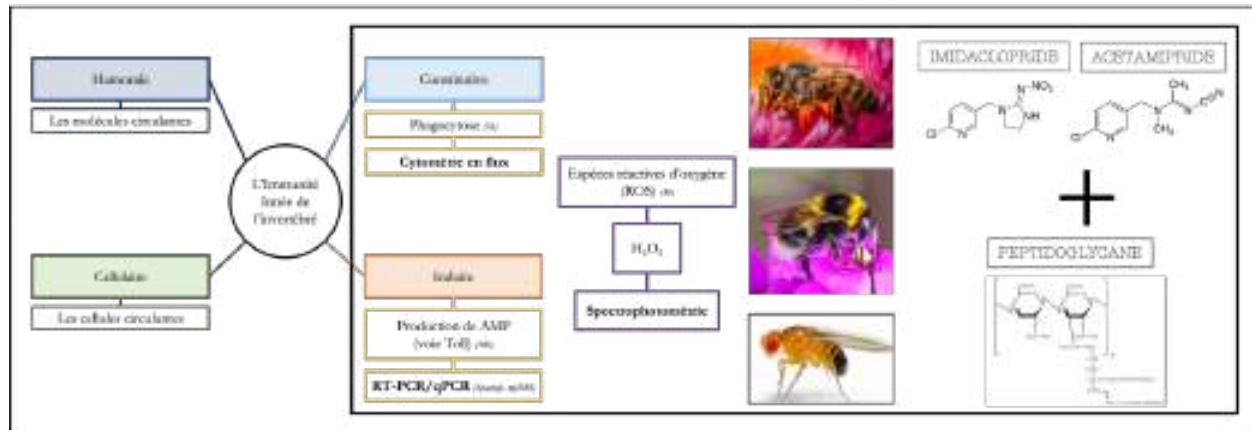


Figure 17 : Description graphique de l'hypothèse scientifique et du résumé entrepris pour l'étude en question. Certaines réponses immunitaires constitutives et induites ont été étudiées dans des hémocytes d'*Apis mellifera*, de *Bombus terrestris* et de *Drosophila melanogaster*, exposés à des mélanges d'imidaclopride (IMI) et d'acétamipride (ACE) après activation immunitaire avec du peptidoglycane (PGN).

2.2 Culture cellulaire

Les plans expérimentaux ont été réalisés *in vitro* en utilisant les hémocytes extraits de trois organismes : *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*.

2.2.1 Les hémocytes de *Drosophila melanogaster* : cellules de Schneider-2

Les cellules immunitaires de *Drosophila melanogaster* (I. Schneider, 1972) ont été sélectionnées pour la mise au point des différents protocoles ainsi qu'à titre de référence (Figure 17). Elles proviennent de la lignée cellulaire Schneider-2 dont le génome a été entièrement décodé (Réf. ACC 130, Leibniz Institute DSMZ™).



Figure 18 : cellules de Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*, frais, dans le milieu Schneider sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5mm)

Les cellules sont stockées dans un milieu de congélation (Annexe III) dans de l'azote liquide. Après la décongélation (Annexe III), elles ont été maintenues à 20°C dans un milieu de culture composé de 44,75 % de milieu Schneider (S0146, Sigma-Aldrich TM), 44,75 % de milieu TC-100 (T3160, Sigma-Aldrich TM), 10 % de sérum vœu fœtal inactivé (SVF/FBS ; F7524, Sigma Aldrich TM), 50 U/mL : 50 µg/mL de de pénicilline + streptomycine (P4458, Signa Aldrich TM) (Schneider, 1972). Afin de maintenir un nombre de cellules constant, elles sont remises en suspension,

centrifugées (500 x g ; 5 mn), les culots remis en suspension dans du milieu neuf et réparties dans des flacons de culture stériles. Les cellules sont ensuite comptées et leur viabilité vérifiée à l'aide du test d'exclusion au bleu de Trypan (2 g/L dans 0,9 % de NaCl).

2.2.2 Les hémocytes d'*Apis mellifera* et de *Bombus terrestris*

Les hémocytes d'*Apis mellifera* et de *Bombus terrestris* sont issus de larves d'insectes et constituent des primo-cultures. Après prélèvement de l'hémolymphe, les hémocytes sont mis en suspension dans du milieu modifié WH-2, préparé selon Hunter, 2010, à savoir composé de milieu Schneider (35,5 %), de L-Histidine (0,06 M ; 47%), du Sérum Vœu Foetal désactivé (SVF/FBS ; 11.8%), de CMRL 1066 (3.5%), de Hank's Balanced Salts (1,18%), du Insect Medium Supplement x 10 (0.47%) et de la Gentamicine (50 µg/mL) (Hunter, 2010).

2.2.2.1 Entretien des ruches d'abeilles et de bourdons

Deux ruches d'abeilles « Langstroth », contenant chacune 10 cadres cirés, ont été installées et entretenues à l'IUT de Thionville-Yutz, France (49.35081683810906, 6.174457617997962). Les ruches ont été supplémentées en pollen et en sirop pendant les mois d'automne et d'hiver, conformément aux pratiques saisonnières recommandées. Pour les protéger de l'infestation du *Varroa destructor*, des bandes Apivar® aux doses de l'amitrazé recommandées ont été utilisées annuellement pendant une période de 10 semaines au cours des mois d'automne. Durant cette période, aucune larve n'est extraite.

Les ruches de bourdons Koppert© Natupol Excel contenant une colonie composée d'une reine, de ses ouvrières et d'un couvain ont été commandées chaque année à Koppert© Biological Systems. Les ruches sont maintenues à l'IUT de Thionville-Yutz à environ 25 m des ruches d'abeilles, à l'abri de la pluie et du vent.

2.2.2.2 Extraction des larves et de l'hémolymphe

Les larves d'abeilles et de bourdons au cinquième stade sont extraites des couvains et déposés dans des boîtes de Petri stériles (Figure 19). Les larves extraites sont utilisées immédiatement ou, si nécessaire, stockées pendant 15 heures au maximum en conditions stériles en étuve (35°C). L'extrémité dorsale de chaque larve est stérilisée en utilisant de l'éthanol à 70% puis ponctionnée à l'aide d'une aiguille stérile. A l'aide d'une micropipette, environ 35 μ L à 50 μ L d'hémolymphe sont extraits de chaque larve. L'hémolymphe de 3 larves est mise en suspension dans 250 μ L de milieu WH-2 modifié.



Figure 19 : (a) cadre de larves de *Apis mellifera* avec des larves du 5^{ème} stade (flèches blanches), (b) larves de *Apis mellifera*, (c) nid de *Bombus terrestris* avec des ouvriers, les cocons nymphes (X) et des larves (flèches blanches) ; image source : Koppert Biological Systems (d) larves de *Bombus terrestris*

2.3 L'exposition cellulaire

L'hémolymphe d'*Apis mellifera* (Figure 20) et du *Bombus terrestris* en suspension dans le milieu WH-2 modifié est mise dans des plaques 24-puits ou 96-puits à une concentration de 2.0×10^5 cellules/mL. Les cellules Schneider-2 sontensemencées dans des plaques à 6-puits, 24-puits ou 96-puits à une concentration de 8×10^6 cellules/mL.

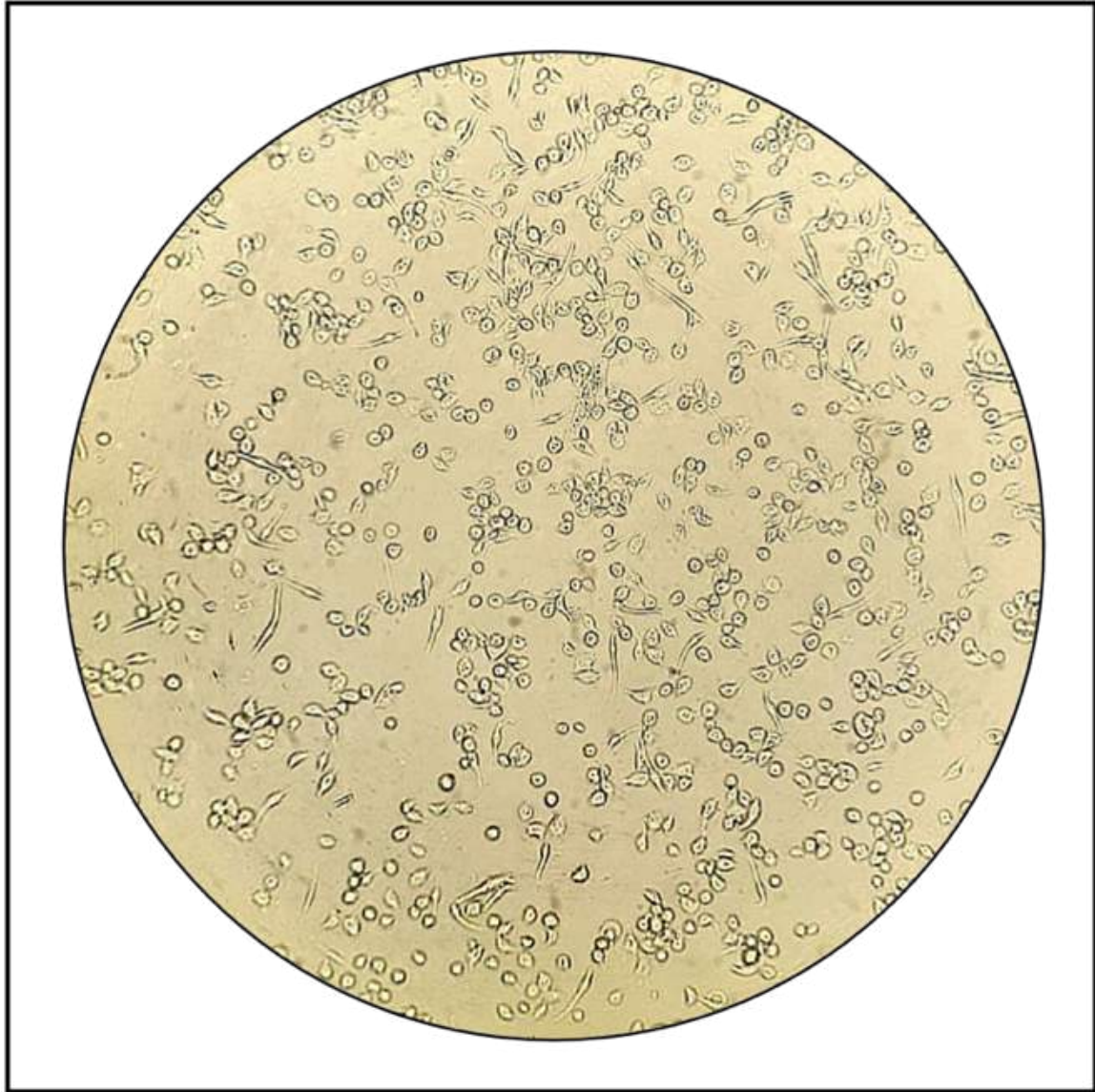


Figure 20 : hémocytes d'*Apis mellifera* après extraction de larves et suspension en milieu WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm)

Les cellules sont ensuite exposées simultanément aux pesticides et à l'activateur immunitaire. Les plaques sont scellées pour empêcher l'échange de gaz ainsi que l'évaporation du milieu et des réactifs, et incubées pendant 3 heures ou 18 heures à 20°C selon le protocole retenu (Section 2.4.).

2.3.1 L'activation immunitaire : le peptidoglycane

Le peptidoglycane est présent dans la paroi cellulaire des bactéries, en plus grande quantité dans les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*. Il s'agit d'un

motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP) qui peut être détecté par les récepteurs de reconnaissance du peptidoglycane (PRR) dans le système immunitaire de l'hôte, ce qui déclenche un ensemble diversifié de réponses immunitaires (Nazario-Toole & Wu, 2017; Vollmer et al., 2008; Yutin et al., 2009).

Dans le cadre du plan expérimental, deux concentrations différentes de PGN d'origine de *S. aureus* (77140, Sigma Aldrich TM) ont été utilisées : 1 µg/mL et 5 µg/mL afin d'observer les réponses immunitaires à deux niveaux d'activation (Brookman et al., 1989; Leulier et al., 2003; Mellroth et al., 2003). Un contrôle (0 µg/mL) a été aussi inclus pour chaque exposition.

2.3.2 L'exposition aux néonicotinoïdes : imidaclopride et acétamipride

Tableau 1 : Plan d'exposition à l'activateur immunitaire et aux pesticides¹

PGN (µg/mL)	IMI (µg/mL)		ACE (µg/mL)		IMI + ACE (µg/mL)				Contrôle (sans IMI ou ACE)
0	6	48	6	48	6 + 6	48 + 48	6 + 48	48 + 6	0
1	6	48	6	48	6 + 6	48 + 48	6 + 48	48 + 6	0
5	6	48	6	48	6 + 6	48 + 48	6 + 48	48 + 6	0

La plupart des études sur la toxicité des néonicotinoïdes sont réalisées *in vivo*, souvent sur des abeilles et des bourdons adultes, à des concentrations réalistes du point de vue de l'environnement (Aliouane et al., 2009; Balieira et al., 2018; Bartling et al., 2021; Chmiel et al., 2020; El Hassani et al., 2008; Grassl et al., 2018; Gregorc et al., 2012, 2018; Iwasa et al., 2004; Laurino et al., 2011; Z. Li et al., 2017; Mengoni Goñalons & Farina, 2015; Shi et al., 2020, 2020; Tesovnik et al., 2017). Cependant, pour stimuler des dommages cellulaires comparables et mieux observer les effets aigus de la C_{max} de l'imidaclopride et de l'acétamipride en utilisant un système de modèle *in vitro*, les

¹ (PGN=Peptidoglycane ; IMI=Imidaclopride ; ACE=Acetamipride)

concentrations choisies doivent idéalement être effectuées en utilisant des doses de 20 à même 200 fois plus élevées que les concentrations d'essai *in vivo*, en suivant une « approche de mise à l'échelle *in vitro-in vivo* » (“*in vivo-in vitro* scaling approach”) (Albrecht, 2020; Hengstler et al., 2020).

Par conséquent, les concentrations de néonicotinoïdes choisies dans cette étude (Tableau 2) sont de 40 à 320 fois plus élevées que les concentrations moyennes détectées dans les échantillons de pollen telles que rapportées dans la littérature (Blacquière et al., 2012; Goulson, 2013; Goulson et al., 2015; Ostiguy et al., 2019), de 2,5 à 20 fois plus élevées que celles testées sur les larves de drosophile (Martelli et al., 2020), et au moins 120 fois plus élevées que la concentration la plus élevée testée sur les abeilles domestiques (Abbo et al., 2017). En outre, des analyses menées au niveau cellulaire avec des concentrations similaires à celles de cette étude, ont effectivement rapporté des effets détectables significatifs (Sukka et al., 2023; Walderdorff et al., 2018; Walderdorff, 2019; Walderdorff et al., 2019).

Pour les expositions simples, une dose faible de 6 µg/mL et une dose élevée de 48 µg/ml ont été utilisées. Pour simuler les effets cocktails, des doubles expositions sont réalisées selon un plan factoriel complet, à savoir 6 µg/ml de chaque pesticide ou 6 et 48 µg/ml de chaque pesticide ou 48 µg/ml de chaque pesticide. Un contrôle (0 µg/mL) est aussi réalisé pour chaque pesticide. Les dilutions de pesticides préparées ont été dosées par HPLC (« High Performance Liquid Chromatography ») pour vérifier les concentrations correctes d'imidaclopride et d'acétamipride utilisées. Des solutions standards d'imidaclopride (46341 Sigma-Aldrich) et d'acétamipride diluées à 100 µg/mL chacune dans de l'acétonitrile ont été utilisées pour les dosages.

Les trois traitements au peptidoglycane (0, 1, 5 µg/mL) ont donc été couplés aux trois concentrations (0, 6, 48 µg/mL) de chaque pesticide, l'imidaclopride et l'acétamipride, soit en exposition simple (une concentration d'un pesticide + une concentration du

peptidoglycane), soit en exposition double (deux concentrations des pesticides + une concentration du peptidoglycane) selon un plan factoriel complet (Tableau 2). Au total, vingt-sept (27) conditions, y compris les contrôles, ont donc été utilisées.

2.4 Mesure de la réactivité cellulaire après exposition

2.4.1 Viabilité

Pour mesurer la mortalité cellulaire induite par la présence de pesticide en contexte de stimulation immunitaire, les cellules traitées selon chacune des 27 conditions (voir Chapitre 2.3.) puis incubées à 20°C dans des plaques à 96-puits scellés pendant 24 heures. Les puits sontensemencés avec 10⁶ cellules/mL de cellules Schneider-2 ou 50 µL d'hémolymphe (10⁵ cellules/mL) d'*Apis mellifera* ou de *Bombus terrestris* en suspension dans le milieu modifié WH-2. Après l'incubation pendant 24 heures, le milieu de culture est retiré et 40 µL de solution de bleu Trypan (2 g/L dans une solution de NaCl à 0,9 % diluée à 1 : 2 avec une solution saline de tampon phosphate, PBS) sont ajoutés aux cellules adhérentes (Figure 21). Après 2 minutes, les puits sont observés au microscope inversé à contraste de phase. Les cellules sont comptées à raison de 250 cellules par puit en distinguant les cellules viables des mortes afin de calculer la viabilité cellulaire.

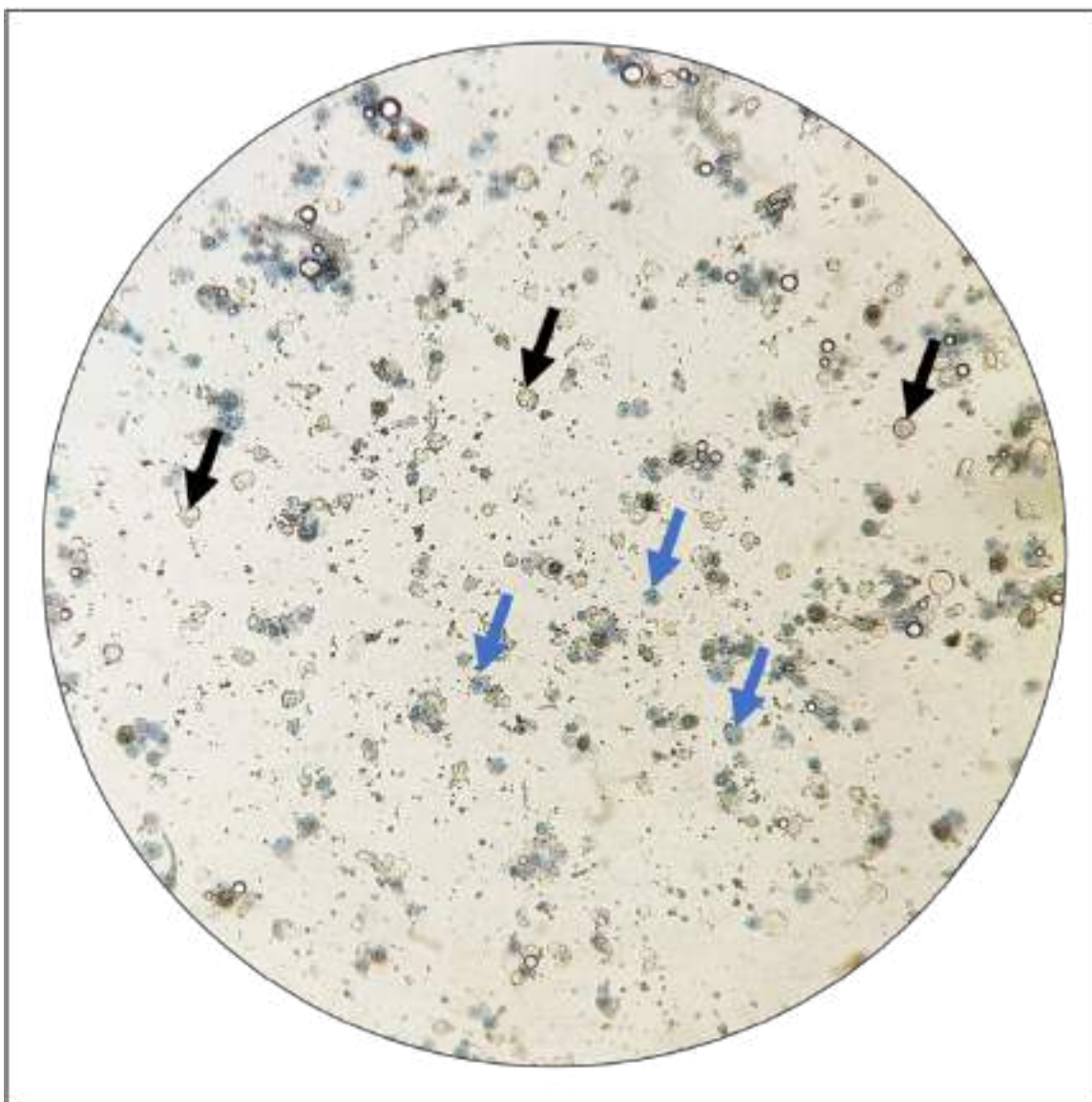


Figure 21 : cellules de *Bombus terrestris* après extraction de larves et suspension en milieu de WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm). Marquage avec Trypan Blue afin de mesurer la viabilité : les cellules mortes (flèches bleus) absorbent le colorant bleu Trypan lorsque leurs membranes cellulaires sont rompues, tandis que les cellules vivantes (flèches noires), dont les membranes cellulaires sont intactes, restent incolores/non marquées.

2.4.2 Détection de H_2O_2 , espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) extracellulaire est mesurée en une étape à l'aide du kit de dosage « Invitrogen™ Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase » (Thermo Fisher Réf. : A22188. L'Amplex™ Red (10-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine), en présence de « horseradish peroxidase » (HRP), réagit avec le peroxyde d'hydrogène dans une réaction stœchiométrique 1 : 1 pour produire

de la « resorufine », un produit d'oxydation rouge-fluorescent qui est dosé (maxima d'excitation/d'émission à 571/585 nm).

2.4.2.1 Préparation des échantillons

Les hémocytes sont incubés avec des pesticides et l'activateur immunitaire dans leurs milieux de culture respectifs dans des plaques à 96-puits (voir *section 3*) pendant 3 heures. Chaque puit contient un volume total de 120 µl. 50 µl de milieu sont prélevés puis reçoivent 50 µl du mélange Amplex™ Red-HRP et sont incubés pendant 30 minutes à 20°C. La plaque est lue à 560 nm.

2.4.2.2 Courbe standard du peroxyde d'hydrogène

Afin de construire une courbe standard de peroxyde d'hydrogène, une gamme de concentrations de H₂O₂ est préparée : 0,00 µM ; 0,625 µM ; 1,25 µM ; 1,875 µM ; 2,50 µM ; 3,75 µM ; 5,00 µM ; 7,50 µM ; 10,00 µM. Le milieu vierge de cellules et de peroxyde d'hydrogène ainsi que la solution tampon sont également été traités et mesurés afin de standardiser l'absorbance de tous les échantillons.

2.4.3 Phagocytose

La capacité d'ingérer au moins une bille de latex par des hémocytes de l'*Apis mellifera*, du *Bombus terrestris* et du *Drosophila melanogaster* est mesurée après 18 heures d'expositions aux 27 conditions décrites en *section 3* en utilisant le cytomètre en flux.

2.4.3.1 Préparation des échantillons

Les cellules sont incubées dans des plaques à 24-puits avec 0,03% des billes de latex en polystyrène, amine-modifiées, jaune-fluorescent de 2 µm de diamètre (Sigma Aldrich) dans du PBS-BSA 3 % pendant 45 minutes à 20°C (Figure 22). Après incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS-BSA 3% et remises en suspension dans du PBS-BSA 3% frais pour la mesure en utilisant le cytomètre de flux « Invitrogen™ Attune™ NxT Acoustic » (Thermo Fisher Scientific).

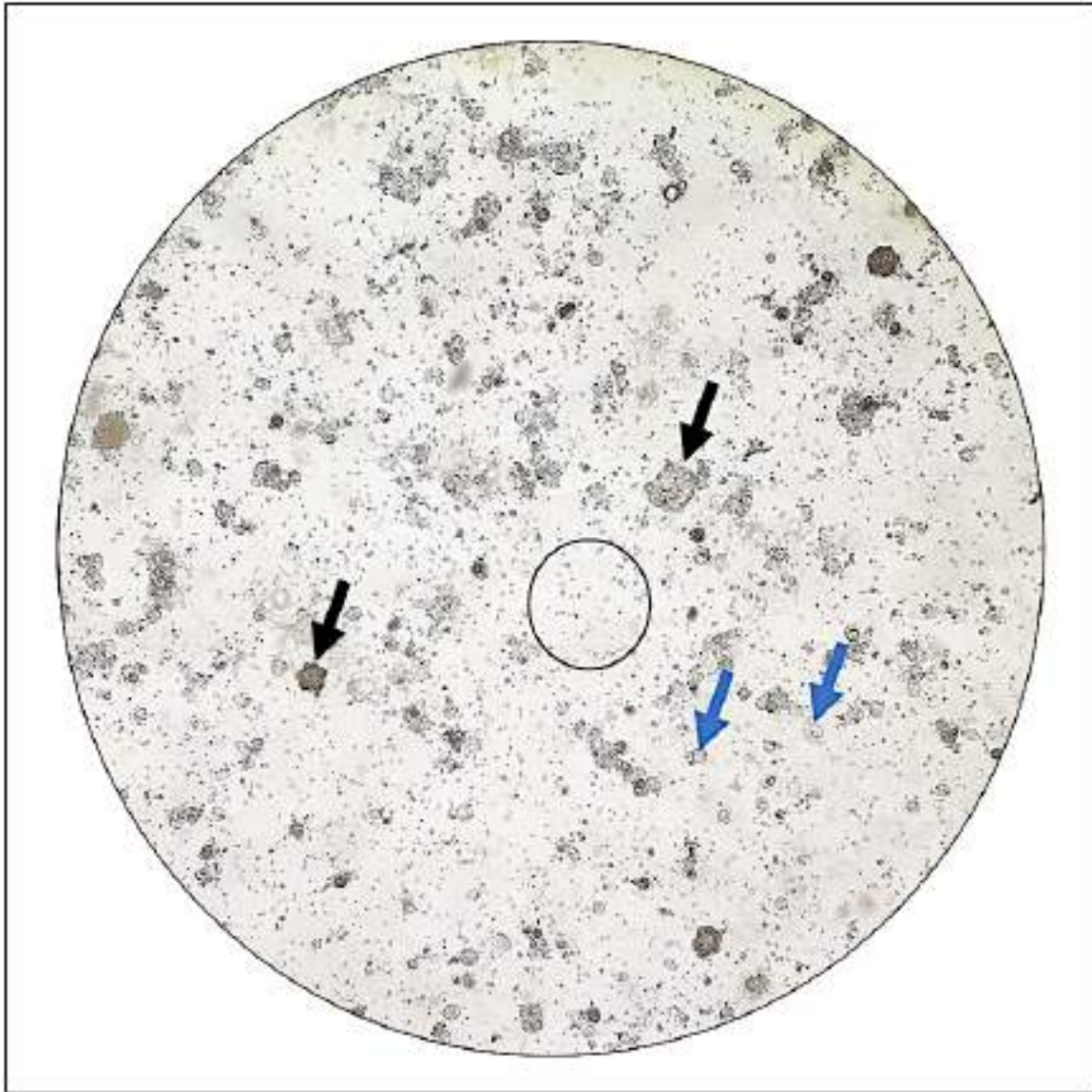


Figure 22 : cellules de *Bombus terrestris* après extraction de larves et suspension en milieu de WH-2 sous microscope optique inversé (grossissement 40x, 5 mm) et incubées avec des billes de latex. Ici, la phagocytose est mesurée par la capacité de la cellule à ingérer au moins une bille de latex. Les cellules couvertes de billes, marquées par des flèches noires, sont en train d'ingérer ces billes. Les cellules qui ne sont couvertes d'aucune bille sont marquées par des flèches bleues.

2.4.3.2 Réglages du cytomètre de flux

La performance du cytomètre de flux est mesurée avant chaque lecture à l'aide d'un étalon de billes (LOT#2408416G, Attune™), afin de garantir la reproductibilité des mesures de diffusion et de fluorescence. Les échantillons sont examinés avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (bleu) selon les réglages de l'instrument

précisés (Tableau 3). La valeur seuil du FSC choisie est fixée de façon à exclure les débris cellulaires et particules de petite dimension.

Tableau 2 : Voltages de FSC, SSC et BLA-1 utilisés pour le réglage de paramètres de la cytomètre en flux

Organisme	Voltage		
	FSC	SSC	BLA-1
<i>Drosophila melanogaster</i>	250	400	300
<i>Apis mellifera</i>	250	400	200
<i>Bombus terrestris</i>	410	440	300

2.4.3.3 Identifications cellulaires

Avant chaque lecture et pour chaque organisme, des cellules non marquées (cellules non incubées avec des billes) sont utilisées pour identifier les populations ciblées en traçant le FSC par rapport au SSC. Les populations de cellules marquées sont ensuite examinées sur un graphique FSC/BLA-1 (Figure 23a., 23d., 23g.), et les population « singlets » respectives sont isolées à l'aide d'un « gating » polygonal (Figure 23b., 23e., 23h.).

Le nombre de cellules phagocytaires est ensuite identifié à partir des populations de « singlets » à l'aide d'un « H-gate » et d'une visualisation par histogramme (Figure 23c., 23f., 23i.). Au moins 5000 événements sont collectés pour chaque répétition. Les données obtenues sont étudiées à l'aide du logiciel associé « Invitrogen™ Attune™ Flow Cytometric Software » et les résultats traduits en pourcentage de cellules phagocytaires.

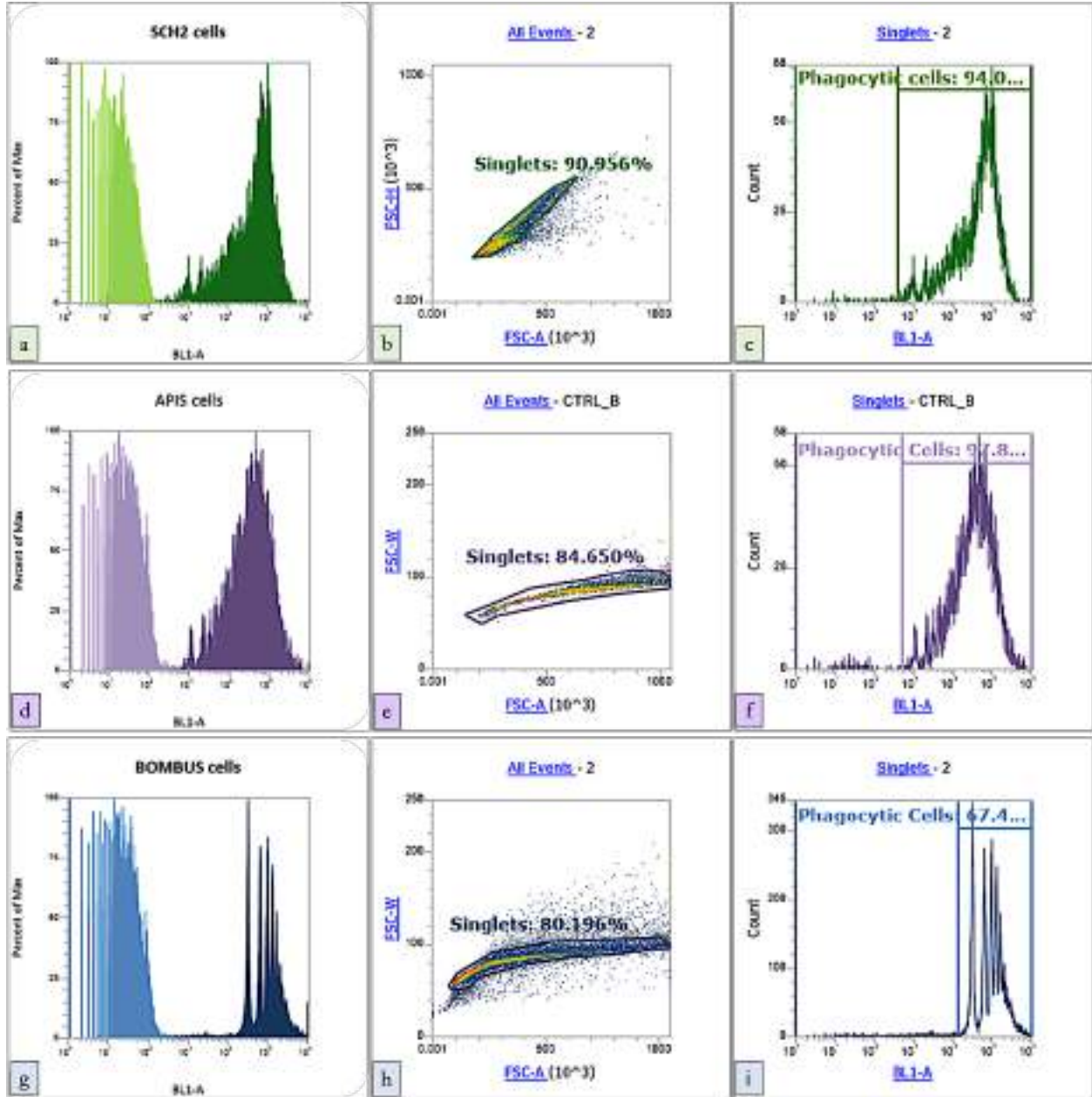


Figure 23 : **a.** hémocytes de *Drosophila melanogaster* non-marqués (vert-clair) et marqués (vert-foncé) ; **b.** isolation de population de singlets (90.95%) avec « polygon gating » ; **c.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (94.0%) ; **d.** hémocytes de *Apis mellifera* non-marqués (violet-clair) et marqués (violet-foncé) ; **e.** isolation de population de singlets (84.65%) avec « polygon gating » ; **f.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (97.8%) ; **g.** hémocytes de *Bombus terrestris* non-marqués (bleu-clair) et marqués (bleu-foncé) ; **h.** isolation de population de singlets (80.196%) avec « polygon gating » ; **i.** « H-gating » pour identifier les cellules phagocytaires (67.4%)

2.5 Mesure de l'expression génétique après exposition

L'expression génétique d'*Apis mellifera*, de *Bombus terrestris* et de *Drosophila melanogaster* est mesurée par RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) après 18 heures d'exposition aux pesticides et à l'activateur immunitaire. Les gènes étudiés

sont : *spaetzle*, *myD88* et *rp49* pour *Apis mellifera*, *spaetzle*, *myD88* et *gapdh1* pour *Drosophila melanogaster*, et *dorsal*, *myD88* et *rpS5R* pour *Bombus terrestris*.

2.5.1 Extraction de l'ARN

L'ARN cellulaire est isolé et extrait d'hémocytes activés avec du peptidoglycane et exposés à l'imidaclopride et à l'acétamipride selon le plan factoriel complet décrit (Section 3.2). Les plaques sont incubées pendant 18 heures à 20°C avec des cellules Schneider-2, des hémocytes d'*Apis mellifera* ou de *Bombus terrestris* avant l'extraction. Au minimum, 3 répliques pour chaque condition, y compris les contrôles, ont été mis en place.

Après la période d'incubation, le milieu est aspiré et centrifugé pour récupérer les cellules en suspension. 1 ml de TRIzol® (Ambion® Life Technologies (Réf. : 15596018)) est ajouté à chaque puit pour lyser les cellules en monocouche. Les cellules en suspension récupérées auparavant y sont ajoutées. Les échantillons lysés sont incubés à température ambiante pendant 5 minutes, rincés puis transférés dans des tubes. Chaque tube reçoit 200 µL de chloroforme. Les échantillons sont à nouveau incubés à température ambiante pendant 3 minutes, après quoi ils sont centrifugés à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C. Après élimination de 80 % du surnageant, 500 µL d'isopropanol sont ajoutés. Les échantillons sont incubés à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C.

Le surnageant éliminé, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 75 % puis centrifugé à 7500 x g pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol est éliminé et le culot est séché à l'air. 50 µL d'eau ultrapure sans RNase sont ajoutés à chaque tube et mélangés pour dissoudre l'ARN, complétant ainsi sa remise en suspension. L'ARN est stocké en aliquotes à -80°C pour les tests ultérieurs.

L'absorbance de l'ARN est mesurée à 260/280 nm et 260/230 nm à l'aide du BioSpec Nano pour quantifier la teneur totale en acide nucléique (ng/ μ L).

2.5.2 Synthèse de l'ADNc

L'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN extrait en utilisant le thermocycleur Bio-Rad iCycler™ et le kit de synthèse d'ADNc « RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis » (Thermo Scientific, #K1631). Toutes les étapes de préparation, sauf indication contraire, sont effectuées sur de la glace afin de maintenir l'intégrité structurale de l'ARN. Pour chaque échantillon, 4000 ng d'ARN sont remis en suspension et 1 μ L d'amorce Oligo(dT) ajoutés. Le mélange est complété à 12 μ L avec de l'eau ultrapure sans ARNase. Ensuite, 4 μ L de Reaction buffer 5X, 1 μ L RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L de 10 mM dNTP Mix et 1 μ L de RevertAid H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) sont ajoutés pour un volume total de 20 μ L. L'incubation des échantillons est faite en deux phases : à 42 °C pendant 60 minutes, puis à 70 °C pendant 5 minutes. Les échantillons sont conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

2.5.3 Conception et optimisation du protocole RT-PCR/qPCR

Le protocole qPCR utilisé a été optimisé en utilisant la lignée cellulaire Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*. L'ARN a été extrait de cellules non traitées et traitées et transcrit en ADNc comme décrit dans les sections 2.4.4.1. et 2.4.4.2.

Les concentrations appropriées d'amorces et d'ADNc ont été déterminées après avoir testé 5 ng, 10 ng et 100 ng d'ADNc avec 0,4 μ M et 1,2 μ M de chaque amorce (avant et arrière). Au moins deux réplicats techniques ont été ensemencés pour chaque échantillon afin d'assurer la répétabilité du protocole. Les concentrations de 100 ng de ADNc et 1.2 μ M de chaque amorce (Tableau 3) ont été retenues pour le RT-PCR/qPCR en suivant.

Tableau 3 : Liste des amorces de *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster* utilisé pour le RT-PCR/qPCR

	Locus	Sequence	Source
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>spatzle</i>	F- 5'-GACACCTGGCAGTTAATTGTCA-3' R- 5'-CGAAGTCACAGGGTTGATCCG-3'	Ewen-C en et al., 2017
	<i>myD88</i>	F- 5'-ATCTGGAACACTTCCTGGGC-3' R- 5'-CCACGAGAGCAGTCTGTCTG-3'	Yadav et al., 2018
	<i>Gapdh1</i>	F- 5'-TAAATTCGACTCGACTCACGGT-3' R- 5'-CTCCACCACATACTCGGCTC-3'	Nakamura et al., 2017
<i>Apis mellifera</i>	<i>spatzle</i>	F- 5'-TGCACAAATTGTTTTCCTGA-3' R- 5'-GTCGTCCATGAAATCGATCC-3'	Evans et al. 2006
	<i>myD88</i>	F- 5'-TCACATCCAGATCCAACCTGC-3' R- 5'-CAGCTGACGTTTGAGATTTTG-3'	Evans et al. 2006
	<i>rp49</i>	F- 5'-CGTCATATGTGCGCAACTGGT-3' F- 5'-TTGAGCACGTTCAACAATGG-3'	Lourenço et al. 2008
<i>Bombus terrestris</i>	<i>Dorsal</i>	F - 5'-TGC ACC GGT TGC TCC ACT TGC TGC-3' R - 5'-TGC GTC GGT CGC TGG TGG TAT GGA-3'	Erlar et al. 2011
	<i>myD88</i>	F - 5'-TTG CCT TCT GAA AAT GGA TTA C-3' R - 5'-TTG CTG TTG CCA AAC TGT TA-3'	Schlüns et al. 2010
	<i>rpS5R</i>	F - 5'-AAT TAT TTG GTC GTT GGA ATT G-3' R - 5'-TAA CGT CCA GCA GAA TGT GGT A-3'	Schlüns et al. 2010

Les températures de fusion (T_m) pour chaque amorce associée à *Apis mellifera* et *Drosophila melanogaster* ont été préalablement déterminées et optimisées à 55 °C selon la méthodologie de Walderdorff et al. (2019). Pour *Bombus terrestris*, le T_m de chaque amorce a été déterminé à 55 °C à l'aide d'un gradient de température allant de 50,5°C à 60,5°C. Les réactions ont été effectuées dans des microplaques optiques qPCR à 96 puits, chaque puits contenant :

- 10 µL de SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Réf. Bio-Rad™-1725275)
- 1,2 µM d'amorce avant et arrière (Invitrogen™)
- 100 ng d'ADNc

- Volume approprié d'eau ultrapure de qualité moléculaire (sans DNase, RNase) pour un volume final de 20 μ L

2.5.4 RT-PCR/qPCR

La réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (Real-Time Polymerase Chain Reaction/qPCR) est réalisée à l'aide du thermocycleur Bio-Rad MyiQ2™ - Two Colour Real-Time PCR Detection System-Optics et du logiciel correspondant. 100 ng d'échantillons d'ADNc synthétisés sont traités à l'aide du Master-Mix SYBR® GREEN et des amorces cibles à 0,05 μ M : *spaetzle* et *myD88* pour *Apis mellifera* et *Drosophila melanogaster* (Invitrogen by Thermo Fisher Réf : 660839). Les gènes de référence utilisés sont *rp49* pour *Apis mellifera*, et *gapdh1* pour *Drosophila melanogaster* (Invitrogen by Thermo Fisher Réf : 175592) (Lourenço et al., 2008). Deux contrôles négatifs (sans ADNc) sont inclus pour chaque amorce utilisée.

Les données de PCR/fusion et les courbes de fusion ont été obtenues en temps réel. Les cycles consistent en :

- Cycle 1 : une répétition à 50 °C pendant 2 minutes.
- Cycle 2 : une répétition à 95 °C pendant 5 minutes.
- Cycle 3 : 45 répétitions à 92°C pendant 15 secondes, 55°C (température de fusion spécifique des amorces) pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes.
- Cycle 4 (courbe de fusion) comportait 71 répétitions à 55°C pendant 15 secondes et se terminait à 95°C.

Les principales données obtenues par qPCR sont les valeurs de cycle seuil (Ct), qui sont déterminées au même seuil de ligne de base de fluorescence de 1000 pour chaque gène. La valeur Ct moyenne de chaque échantillon est calculée en utilisant la moyenne géométrique des répliques techniques. C'est cette valeur qui est utilisée dans les calculs finaux. Les données sont traitées à l'aide de la méthode $\Delta\Delta$ Ct de Livak et al. (2000).

Les valeurs ΔC_t sont calculées à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta C_t = C_t (\text{gène d'intérêt}) - C_t (\text{gène de maintien})$$

Le $\Delta\Delta C_t$ est déterminé :

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{échantillon traité}) - \Delta C_t (\text{échantillon non traité})$$

Le ΔC_t (*échantillon non traité*), désormais appelé « calibrator », est dérivé de la moyenne arithmétique du ΔC_t du contrôle de chaque concentration de PGN. Une augmentation d'un facteur 2 est appliquée à la valeur négative du $\Delta\Delta C_t$. Cette valeur est enregistrée pour standardiser les données entre les trois différents traitements PGN. Les données finales utilisées pour l'analyse statistique sont le $\text{LOG}(2^{-(\Delta\Delta C_t)})$.

2.6 Analyses Statistiques

Toutes les données sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel XLSTAT (Addinsoft, version 2019.3.2). Les résultats sont exprimés comme la moyenne des 3 répliques pour chacun des traitements $\pm$ SE (erreur standard). Les données sont testées pour la normalité de la distribution et l'homogénéité de la variance en utilisant les tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett ($p = 0,05$).

Une ANOVA a été réalisée pour les données dont les conditions de normalité et homogénéité sont validées (données paramétriques ; valeur $p > 0,05$), afin d'identifier les différences entre les conditions. Cette analyse est complétée par un test post-hoc de Duncan et Tukey pour les comparaisons multiples entre les différentes conditions (Annexe IV-VII).

Les données ne répondant pas aux conditions de normalité et d'homogénéité (valeur $p < 0,05$) ont été analysées avec un test de Kruskal-Wallis, suivi d'une comparaison par

MATÉRIELS ET MÉTHODES

paires de Dunn pour vérifier toute différence entre les groupes. Le coefficient de variation a également été calculé pour déterminer la variabilité au sein des groupes (Annexes IV-VII).



RÉSULTATS & DISCUSSION



3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats pour la réactivité cellulaire et l'expression génétique pour les trois espèces étudiées – *Apis mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster*, après leurs traitements avec le peptidoglycane et l'exposition à l'imidaclopride et l'acétamipride, sont présentés ci-dessous.

3.1 Impact des néonicotinoïdes (IMI, ACE) sur la viabilité cellulaire

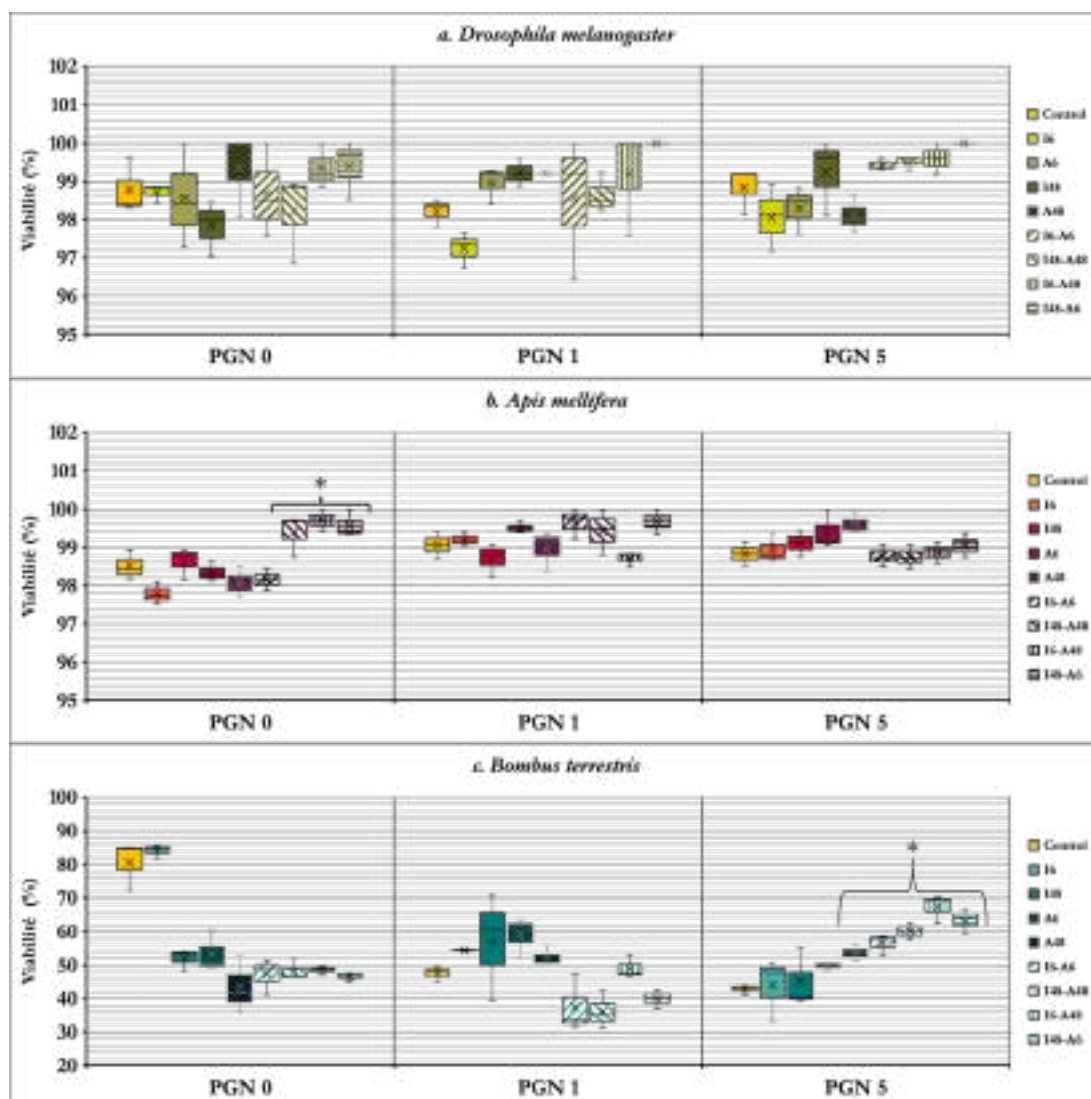


Figure 24 : Viabilité (%) des hémocytes de (a.) *Drosophila melanogaster*, (b.) *Apis mellifera* et (c.) *Bombus terrestris* après exposition au peptidoglycane (PGN 0, 1, et 5 µg/ml), à l'imidaclopride (I 6 et 48 µg/ml) et à l'acétamipride (A 6 et 48 µg/ml) pendant 24 heures. Les différences significatives par rapport au contrôle sont indiquées par un astérisque (a. et b. ANOVA, c. Kruskal-Wallis, $p < 0.05$, $n = 3$).

La viabilité cellulaire de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* est mesurée afin d'évaluer le degré de cytotoxicité de l'imidaclopride (IMI) et de l'acétamipride (ACE) aux concentrations testées. Les cellules ont été exposées à chacune des conditions testées : imidaclopride ou acétamipride, seul ou en cocktail, avec activation immunitaire par différentes concentrations de PGN (0, 1 et 5 µg/ml) pendant 24 heures. Les cellules mortes sont ensuite quantifiées à l'aide du Trypan Blue.

La viabilité des cellules Schneider-2, cellules issues de *Drosophila melanogaster*, n'a varié de manière significative pour aucun des traitements comparés à leurs contrôles respectifs (Figure 24a). La mortalité des cellules reste faible après 24 heures d'exposition à l'IMI et à l'ACE quelles que soient les concentrations utilisées : la mortalité la plus élevée observée est de 3 % lorsque les cellules sont exposées à 1 µg/ml de PGN et à 6 µg/ml d'IMI, sans différence significative par rapport au contrôle.

Les cellules Schneider-2 sont une lignée cellulaire établie et robuste, adaptée à une utilisation comme système modèle pour les études *in vitro*. Elles présentent une faible cytotoxicité lorsqu'elles sont exposées à des produits chimiques tels que les pesticides, en raison de multiples et puissantes enzymes de détoxification des pesticides, telles que les carboxylestérases, les cytochromes P450 (CYP450) et les glutathion-S-transférases (GST) (Daborn et al., 2012; Echalié, 2018; Luhur et al., 2019; Schetz & Shankar, 2004). En particulier, *D. melanogaster* exprime *Cyp6g1*, un gène responsable de la production de l'enzyme P450 Cyp6g1 qui confère une résistance notamment aux néonicotinoïdes et au DDT (Daborn et al., 2012). La forte viabilité observée ici est donc cohérente avec celle trouvée dans la littérature.

Les hémocytes d'abeille présentent également une viabilité supérieure à 97 %, quel que soit le type de traitement (Figure 24b). Il est intéressant de noter que les hémocytes

sans stimulation immunitaire (PGN 0) traités avec des cocktails contenant les plus fortes doses d'IMI ou d'ACE (I48-A48 ; I6-A48 ; I48-A6) présentent une viabilité d'au moins 2 % plus élevée que le contrôle. Bien que la différence ne soit pas significative, les cellules traitées avec 5 µg/mL de PGN tendent également à montrer une viabilité plus élevée lorsqu'elles sont exposées à l'IMI ou à l'ACE individuellement. Des résultats similaires ont été rapportés par Sukkar *et al.* (2023) pour des hémocytes d'abeilles exposés à des mélanges contenant des doses élevées (50 µg/mL) d'imidaclopride ou d'amitrazé (Sukkar et al., 2023). Cela pourrait suggérer que les mécanismes de détoxification dans les hémocytes d'abeilles sont engagés rapidement et plus efficacement lorsque les cellules sont confrontées à des doses élevées de pesticides, par opposition à des doses plus faibles qui peuvent ne pas être perçues comme une menace cytotoxique par les systèmes de défense cellulaire (Cheng et al., 2020; Hernández et al., 2013).

Les hémocytes de bourdons présentent généralement une viabilité plus faible que ceux des abeilles et des mouches des fruits quel que soit le traitement (Figure 24c). Ils ont également montré une plus grande variabilité de réponse, avec des différences significatives par rapport au contrôle lorsque les cellules sont traitées avec 5 µg/mL de PGN et exposées à des cocktails d'IMI et d'ACE.

Parmi les groupes de cellules de bourdon non soumises à un défi immunitaire (Figure 24c., PGN 0), les hémocytes non exposés aux pesticides (IMI 0, ACE 0) et ceux traités avec 6 µg/ml d'IMI seul présentent la mortalité la plus faible. Plus de 80 % des cellules de ces deux groupes sont viables, toutefois sans que cet effet ne soit significativement différent par rapport aux autres expositions. Ainsi, pour les hémocytes de bourdons, une faible dose d'IMI est comparable à une absence totale d'exposition aux pesticides. Parmi les autres conditions testées, les cocktails d'imidaclopride et d'acétamipride présentent la viabilité la plus faible, souvent

inférieure à 50 %. Il convient de noter que 48 µg/mL d'IMI et 6 µg/mL d'ACE ont eu un effet comparable, ce qui suggère qu'une petite dose d'acétamipride (cyanosubstitué) peut être aussi puissante sur les hémocytes de bourdons que l'imidaclopride (nitrosusubstitué).

Lorsqu'ils ont été soumis à un défi immunitaire modéré (Figure 24c., PGN 1), la cytotoxicité semble plus élevée pour les hémocytes de bourdons dans quatre des huit conditions testées avec une viabilités inférieure à 50 %. Par ailleurs, ces quatre traitements étaient tous des cocktails de IMI et d'ACE, ce qui indique que les cellules de bourdons soumises à un défi immunologique sont probablement plus vulnérables aux mélanges de néonicotinoïdes.

Inversement, avec une stimulation immunitaire plus forte (Figure 24c., PGN 5), la viabilité des hémocytes de bourdons avec ces mêmes quatre mélanges, ainsi qu'avec 48 µg/mL d'ACE, augmente de manière significative par rapport au contrôle et aux expositions d'IMI seul et de 6 µg/mL d'ACE seul (Figure 24c). Ces résultats sont similaires à ceux des hémocytes d'abeilles, suggérant une fois de plus que des doses plus élevées de néonicotinoïdes et de leurs cocktails déclenchent des mécanismes de détoxification plus puissants tels que les enzymes de détoxifications CYP450, GST et carboxylestérases, car ils sont perçus comme une menace cytotoxique plus puissante (Cheng et al., 2020; Hernández et al., 2013). À noter que, en ce qui concerne les bourdons, cette réaction de renforcement n'a été observée qu'avec une activation immunitaire plus importante (PGN 5), illustrant une augmentation de la sensibilité de ces hémocytes aux pesticides lors d'infections bactériennes.

Des mécanismes de détoxification spécifiques à l'espèce déterminent la cytotoxicité des néonicotinoïdes

La variation de la viabilité cellulaire observée entre les trois espèces indique que les mécanismes de détoxification contre le même produit chimique et la même dose sont souvent spécifiques à l'espèce. Les abeilles mellifères et les bourdons, en particulier, présentent des sensibilités différentes à l'action de néonicotinoïdes, principalement en raison de mécanismes de détoxification différents contre les groupes nitrosubstitués (7b., groupe NO) et cyanosubstitués (7c., groupe CN) au sein de la classe des néonicotinoïdes. C'est ce que suggèrent notamment les études sur le métabolisme des néonicotinoïdes chez les insectes. Iwasa *et al.* (2003) ont démontré la létalité différentielle de l'imidaclopride et de l'acétamipride sur des abeilles domestiques adultes, montrant que l'imidaclopride était trois fois plus létale (DL50 de 0,0179 µg/abeille) que l'acétamipride (DL50 de 7,07 µg/abeille) (Iwasa et al., 2004). Cette différence a été attribuée au mécanisme de détoxification par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450). Les CYP450 sont responsables de la dégradation des composés xénobiotiques tels que les néonicotinoïdes (en particulier l'enzyme P450 Cyp6g1) et semblent rendre les néonicotinoïdes substitués par le radical CN (ACE) moins toxiques que leurs homologues substitués par NO (IMI) (Daborn et al., 2012; Iwasa et al., 2004).

Chez les insectes, les enzymes CYP450 métabolisent l'acétamipride en n-diméthyle-acétamipride (IM-2-1), en alcool 6-chloro-pyridilméthyle (IM-O) et en acide 6-chloronicotinique (IC-O), qui se sont révélés non létaux pour les abeilles par application topique (Iwasa et al., 2004). Ces enzymes, ainsi que les glutathion synthases (GSS), semblent également jouer un rôle dans le métabolisme de l'imidaclopride (Pang et al. 2020), bien que leur action exacte ne soit pas encore totalement comprise. Il est également possible que, chez les espèces d'abeilles, ces

mécanismes de détoxification diffèrent d'une colonie à l'autre (Suchail et al., 2001) (Suchail et al. 2001).

En étudiant l'effet des co-expositions d'imidaclopride et d'amitraze sur les hémocytes d'abeilles, Sukkar *et al.* (2023) ont émis l'hypothèse que l'imidaclopride pourrait empêcher la production d'enzymes qui hydrolysent l'amitraze en un métabolite plus toxique, le DMPF, (N-(2,4-diméthylphényl)-N-méthylformamidine), ce qui aurait atténué l'effet de l'amitraze et de ses métabolites enduisant une amélioration de la viabilité (Sukkar et al., 2023). Par ailleurs, Suchail *et al.* (2001) ont démontré que les métabolites de l'imidaclopride, l'oléfine et le 5-hydroxyimidaclopride, sont aussi létaux, sinon plus, que le composé d'origine (Suchail et al., 2001). Il est possible que, dans notre étude, l'acétamipride ait interféré avec l'hydrolyse enzymatique de l'imidaclopride, inhibant ainsi la production de métabolites plus toxiques. Cependant, les métabolites de l'acétamipride n'étant pas aussi toxiques, que ceux de l'amitraze, la détoxification différentielle des mélanges d'imidaclopride et d'acétamipride a un impact moindre sur la viabilité cellulaire que leur application individuelle.

Les bourdons, en revanche, sont moins étudiés en raison de leur statut de pollinisateurs sauvages. Leurs nids sont beaucoup plus petits et il existe une plus grande diversité au sein du genre *Bombus* (Goulson, 2010; Goulson & MacLean, 2010). La hiérarchie au sein des nids de bourdons est également moins rigide que dans les ruches d'abeilles, bien que l'on sache que la taille du corps joue un rôle important dans certains aspects de la fonctionnalité et de l'immunité du nid (Shpigler et al., 2013). En effet, chez les bourdons, les mécanismes de détoxification des néonicotinoïdes sont différents entre les reines, les mâles et les ouvrières. Il apparaît ainsi que la caste et le sexe des bourdons jouent un rôle majeur dans la détoxification enzymatique du clothianidine, un néonicotinoïde nitrosubstitué comme l'imidaclopride (Mobley & Gegear, 2018) : les reines et les mâles ont une survie réduite par rapport aux ouvrières

lorsque des doses chroniques de clothianidine sont administrées par voie orale. Ce mode de contact a induit également plusieurs effets sublétaux parmi les ouvrières et les mâles, modifiant l'expression génétique de 332 gènes associés à la physiologie et à la fonction, y compris l'immunité et la reproduction. Cette différence de détoxification et de résistance aux pesticides au sein d'un même nid serait due à une "susceptibilité haploïde" (Mobley & Gegear, 2018). Sur les quelques 500 gènes exprimés pour la résistance aux pesticides et les réponses au stress chez *Bombus huntii*, la reine et les ouvrières diploïdes disposent d'un plus grand arsenal de gènes et de ressources pour la détoxification des néonicotinoïdes que les bourdons mâles haploïdes. En outre, cette diversité dans l'expression génétique est également répercutée sur les stades de vie, les femelles adultes ayant porté plus de gènes que leurs homologues larvaires et nymphales (Xu et al., 2013). Une autre cause possible susceptible d'expliquer cette divergence pourrait être que l'allocation énergétique chez les reines et les mâles pour la reproduction pourrait limiter les ressources consacrées à la résistance aux pesticides, bien que cela n'ait pas encore fait l'objet d'une étude approfondie (Mobley & Gegear, 2018; Xu et al., 2013).

Trois groupes enzymatiques principaux participent à la détoxification des pesticides chez les insectes : les estérases (comme le carboxylestérases), les glutathion-S-transférases (GST) et les monooxygénases (Clark & Shamaan, 1984; Grant & Matsumura, 1988; Győri et al., 2017). Cependant, jusqu'à présent, ces systèmes n'ont été étudiés que contre des pesticides plus anciens tels que les carbamates et les organophosphorés, et les expositions uniques et non de mélanges de pesticides. Il est important de noter que les néonicotinoïdes, qui constituent une classe d'insecticides plus récente, sont encore mal compris en ce qui concerne leur devenir métabolique chez les insectes non ciblés, tels que le bourdon. En outre, bien qu'ils soient similaires dans leur ciblage des nAChR, ils sont toujours chimiquement distincts les uns des autres (composés nitrosubstitués et cyanosubstitués au sein de la même classe, par

exemple) et déclenchent donc probablement des mécanismes de détoxification différents à des doses comparables, comme le montrent les résultats de cet essai.

Enfin, l'absence de mortalité élevée à la suite d'une exposition aux néonicotinoïdes, en particulier chez les abeilles mellifères et les drosophiles, ne peut être le seul baromètre de l'impact des néonicotinoïdes sur les insectes pollinisateurs et d'autres insectes non ciblés. La mortalité n'est qu'un biomarqueur unique et binaire qui n'est pas représentatif de la santé globale des insectes. Actuellement, la mortalité des abeilles est déterminée sur la base des valeurs de DL_{50} rapportées dans la littérature. Cependant, ces résultats sont basés sur des tests en laboratoire ou sur le terrain sur des abeilles adultes et ne sont pas souvent pondérés pour inclure les larves, qui, par elles-mêmes, ont un système immunitaire distinct de celui de leurs homologues adultes, comme nous l'avons vu plus haut. L'hémolymphe des larves a une composition différente de celle des adultes, en particulier chez les abeilles mellifères et les bourdons. De plus, les larves d'abeilles mellifères contiennent un nombre beaucoup plus élevé de granulocytes et de cellules perméabilisées que les abeilles adultes et la reine (Richardson et al. 2018). En outre, comme les gènes exprimés pour la résistance aux pesticides varient selon la caste, le sexe et les étapes de la vie de l'insecte, l'impact des néonicotinoïdes sur les larves peut être très différent de ce qui est observé chez les adultes, les abeilles ouvrières femelles et même les reines (Mobley & Gegear, 2018; Xu et al., 2013). Cette seule distinction pourrait engendrer un effet non seulement sur la qualité de la réponse immunitaire à travers les stades différents chez les espèces d'abeilles, mais aussi sur l'intensité de l'impact des pesticides, qu'ils soient seuls, en mélange et/ou en présence de pathogènes.

3.2 Impact des néonicotinoïdes (IMI, ACE) sur la phagocytose

Les cellules de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* ont été exposées pendant 18 heures à deux concentrations d'IMI et d'ACE (6 µg/ml et 48 µg/ml), soit en exposition unique, soit en cocktail, avec une activation immunitaire par différentes concentrations de PGN (0, 1 et 5 µg/ml). La capacité des hémocytes à phagocyter au moins une bille de latex, mesuré par cytomètre en flux, a été significativement affectée dans des conditions de traitement multiples.

3.2.1 *Drosophila melanogaster*

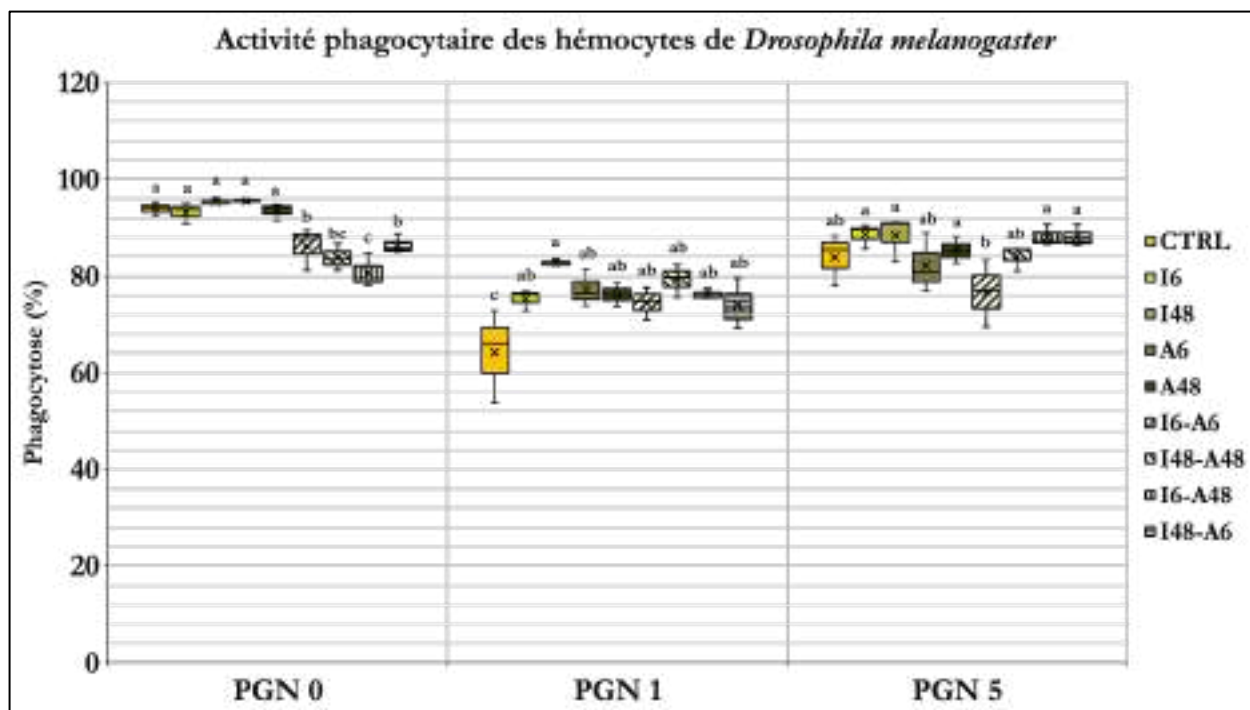


Figure 25 : Activité phagocytaire chez *Drosophila melanogaster* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Environ 95 % des hémocytes de drosophile n'ayant reçu aucune stimulation immunitaire (Figure 25, PGN 0) ni exposition aux néonicotinoïdes (IMI 0, ACE 0) sont capables de phagocyter au moins une bille de latex. Alors que les expositions individuelles à l'IMI ou à l'ACE n'ont pas d'effet observable différent du contrôle, une réduction significative de l'activité phagocytaire est mesurable lorsque les cellules sont

exposées aux quatre cocktails de IMI + ACE. L'effet le plus important est observé avec I6-A48 : les cellules ont phagocyté 15 % de moins que le groupe témoin ainsi que les cellules exposées individuellement à l'IMI ou à l'ACE. En outre, I6-A6 et I48-A6 ont des effets comparables, tout comme I48-A48 : les cellules ont phagocyté environ 10 % de moins que celles du groupe témoin. Les mélanges contenant une concentration plus faible d'IMI que d'ACE (I6-A48) ont un effet négatif plus important que ceux contenant des doses égales des deux néonicotinoïdes (I6-A6 ou I48-A48) ou les cocktails contenant une concentration plus faible d'ACE (I48-A6). Ces résultats pourraient suggérer que l'IMI et l'ACE ont un effet antagoniste lié à la dose sur les cellules.

Contrairement aux cellules non stimulées par PGN, 65 % des cellules exposées uniquement à 1 µg/mL de PGN (IMI 0, ACE 0) sont capables de phagocyter au moins une bille de latex (Figure 25, PGN 1). Il s'agit d'une réduction de 31 % par rapport au groupe témoin de PGN 0. De plus, les hémocytes activés et exposés simultanément à des expositions uniques ou à des co-expositions d'IMI et d'ACE phagocytent plus de billes que le groupe témoin, soit de 15 % à 28 %. Il n'y a pas de différence dans la capacité phagocytaire entre les types d'exposition, car les expositions individuelles et les expositions en cocktail augmentent de manière comparable la phagocytose. L'effet dose-dépendant et antagoniste observé précédemment sans activation immunitaire (PGN 0) n'est donc plus observé avec PGN 1.

Aucun effet significativement différent du contrôle n'est observé sur les cellules soumises à un défi immunitaire plus fort (Figure 25, PGN 5) quelles que soient les conditions testées. Les cellules phagocytent de façon comparable au contrôle avec ou sans exposition aux néonicotinoïdes, en maintenant globalement un taux de phagocytose de plus de 80 %. Ceci représente certes 10 % de moins que les

hémocytes qui n'ont pas été activés (témoin PGN 0), mais 22 % de plus que les cellules qui ont reçu une stimulation modérée (témoin PGN 1). Cependant, parmi les expositions aux mélanges de pesticides, I6-A6 a un effet négatif plus important : la phagocytose diminue de 10 % à 15 % en comparaison des trois autres mélanges, une différence significative entre les cocktails.

3.2.2 *Apis mellifera*

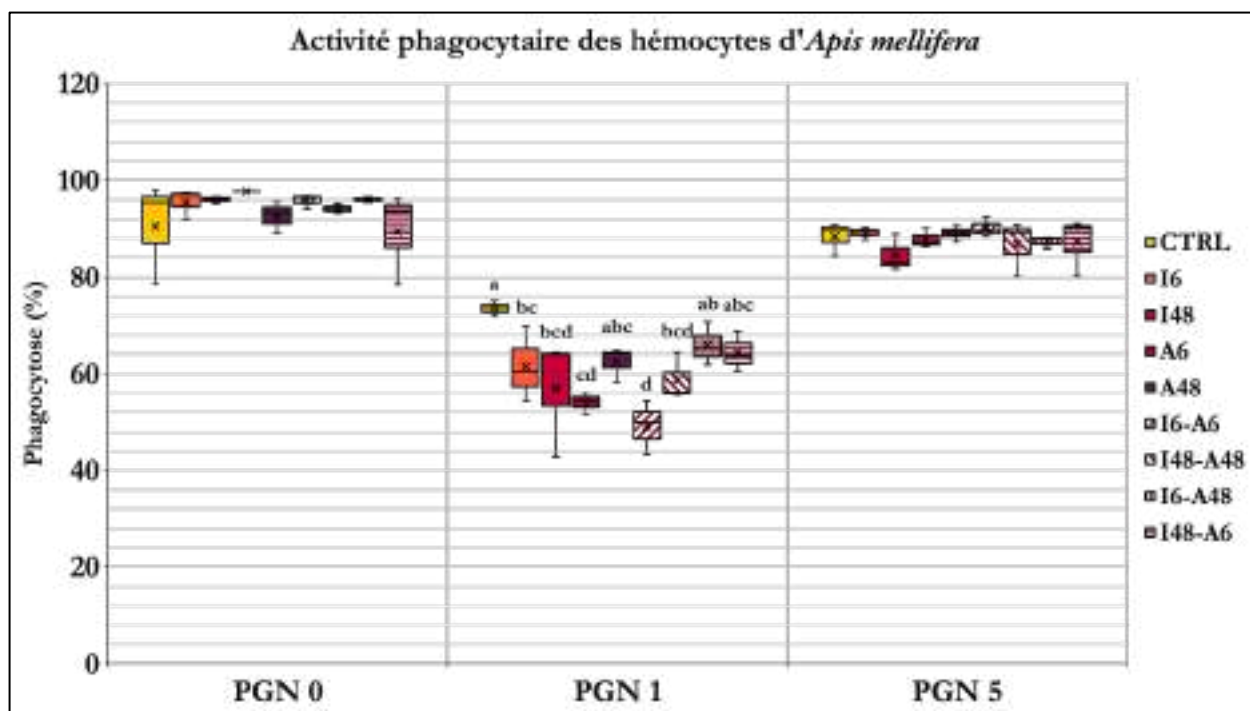


Figure 26 : Activité phagocytaire chez *Apis mellifera* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (*ANOVA*, $p < 0.05$, $n = 3$)

La phagocytose n'est pas affectée pour les hémocytes d'abeilles exposés à IMI ou à ACE en l'absence de PGN par rapport aux cellules du groupe témoin (IMI 0, ACE 0). Il n'y a pas non plus d'effet observable entre les expositions uniques et les co-expositions à IMI et à ACE (Figure 26). Pour toutes ces conditions, plus de 90 % des cellules ont phagocyté au moins une bille de latex. Il en est de même lorsque les cellules sont traitées avec 5 $\mu\text{g/mL}$ de PGN avec ou sans exposition aux pesticides.

Cependant, lorsque les hémocytes sont exposés à 1 µg/mL de PGN combiné à l'IMI et à l'ACE, soit en exposition unique, soit en mélange, la capacité phagocytaire est réduite d'au moins 16 % (I6 et A48) et au maximum de 31 % (I6-A6) par rapport au contrôle (73 %) (Figure 26). En particulier, le cocktail I6-A6 a un effet suppressif plus important que les cocktails I6-A48 et I48-A6. Ce phénomène a également été observé précédemment avec des hémocytes de drosophile, traitées avec le PGN 5 (Figure 25). En outre, par rapport aux cellules non stimulées (témoin PGN 0), l'activité phagocytaire en présence de PGN diminue globalement d'au moins 18 %. La tendance observée ici confirme l'effet cumulatif du pathogène et du pesticide sur la phagocytose.

3.2.3 *Bombus terrestris*

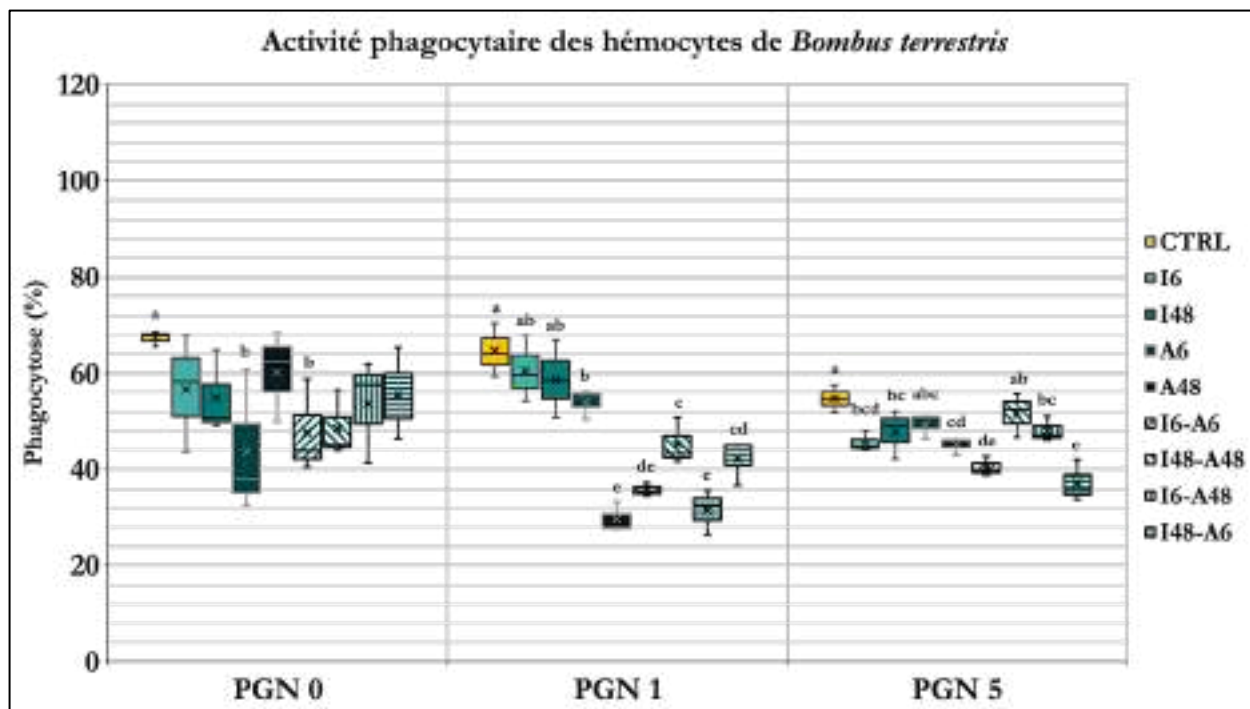


Figure 27 : Activité phagocytaire chez *Bombus terrestris* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 18 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Les hémocytes de *Bombus terrestris* se révèlent être les plus affectés par IMI et ACE en présence de PGN (Figure 27). En l'absence de défi immunitaire (PGN 0), seuls 67 %

des hémocytes de bourdons sont capables de phagocyter au moins une bille de latex soit presque 30 % de moins que ce qui a été observé chez les abeilles et les drosophiles dans les mêmes conditions. Une réduction significative de la phagocytose est également observée dans ce traitement (PGN 0) lorsque les cellules sont exposées à A6 (-35 %) et à I6-A6 (-29 %). Bien qu'elles ne soient pas significativement différentes, les cellules dans les autres conditions du même groupe tendent également moins phagocyter que le contrôle.

Avec l'activation immunitaire PGN 1, 65 % des hémocytes de bourdons phagocytent au moins une bille de latex ce qui est similaire aux hémocytes de bourdons sans activation immunitaire (PGN 0) (Figure 27). La phagocytose est ici comparable à celle des hémocytes de drosophile, mais inférieure de 12 % à celle des cellules d'abeilles dans les mêmes conditions. En cas d'activation immunitaire, les hémocytes exposés à 6 µg/mL et 48 µg/mL d'ACE phagocytent 16 % et 53 % de moins, respectivement, que ceux du groupe témoin et ceux exposés à IMI. Dans ce cas, ACE à 48 µg/mL a eu un effet beaucoup plus fort qu'à 6 µg/mL. La réduction de la phagocytose est encore plus prononcée avec chacun des quatre mélanges : les hémocytes de bourdons exposés à I6-A6, I48-A48, I6-A48 et I48-A6 phagocytent respectivement 46 %, 30 %, 52 % et 35 % de moins que le contrôle. Une différence importante est observée entre les cocktails I48-A48 et I6-A48, ce dernier ayant un effet négatif plus important. Il est probable qu'en présence de PGN, des concentrations plus élevées IMI puissent affecter la puissance d'ACE dans les cocktails, IMI se comportant comme un antagoniste.

Lorsque la stimulation immunitaire augmente (PGN 5), les cellules de bourdons sont plus affectées par les quatre cocktails d'IMI et d'ACE que par les expositions uniques, bien que la phagocytose ait généralement diminué dans chacune des huit conditions testées (Figure 27). 55 % des hémocytes de bourdons stimulés uniquement avec du

PGN 5 (IMI 0, ACE 0) phagocytent au moins une bille de latex. Avec l'exposition aux néonicotinoïdes, l'effet le plus important est observé avec I6-A6 et I48-A6, où moins de 40 % des cellules sont capables de phagocyter.

L'infection bactérienne et l'intoxication par les néonicotinoïdes entravent la phagocytose chez *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* avec des effets cumulatifs, mais pas chez *Drosophila melanogaster*.

La différence marquée entre les effets des néonicotinoïdes sur les hémocytes de drosophiles, d'abeilles et de bourdons suggère que les hémocytes de bourdons, suivis des hémocytes d'abeilles, sont généralement plus sensibles à IMI et à ACE, en particulier lorsqu'ils sont co-exposés au cours d'une infection bactérienne. La phagocytose peut être déclenchée avec ou sans infection bactérienne, les résultats ci-dessus semblent indiquer que cette activation différentielle est régie par des voies de signalisation différentes. En l'absence de PGN, et donc d'infection bactérienne, les billes de latex sont reconnues comme "étrangères" et déclenchent la phagocytose indépendamment de la voie Toll (Desjardins & Griffiths, 2003; Gu et al., 2014; Hayashi et al., 2003; Schroeder & Kinden, 1983). Dans ces conditions, les mélanges de néonicotinoïdes, en dehors des variations de doses, sont capables soit d'entraver la phagocytose des hémocytes de drosophile, soit d'avoir un effet variable sur les hémocytes des bourdons et des abeilles.

Cependant, avec un défi immunitaire modéré (PGN 1), représentatif d'une infection bactérienne à Gram positif, la phagocytose est déclenchée par l'activation de la voie de signalisation Toll via le complexe PRR-PAMP, ainsi que par la reconnaissance des billes de latex. Ici, IMI et ACE amplifient de manière significative la phagocytose des hémocytes de drosophile, ou entravent celle des hémocytes d'abeilles et de bourdons, que ce soit en simple ou co-exposition. Il est probable que la phagocytose initiée par

la voie Toll soit plus vulnérable à l'interférence des néonicotinoïdes peut-être en raison d'une réorientation des ressources et de l'énergie vers la voie de péage. Comme la voie Toll et ses produits dépendent fortement de l'expression de gènes tels que *Toll*, *spatzle* et *myD88*, il est probable que IMI et/ou ACE inhibent l'expression génétique, réduisant ainsi également l'activité phagocytaire.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de Walderdorff et al. 2018 où une diminution de la phagocytose a été observée pour les hémocytes de drosophile, d'abeille et de bourdon, activés avec du LPS (lipopolysaccharide provenant de bactéries Gram négatives) et exposés à des concentrations d'IMI allant de 1 µg/ml à 100 µg/ml pendant 5 heures ou 24 heures. L'étude a révélé une diminution globale de la phagocytose de 15 % chez les abeilles mellifères et de 45 % chez les bourdons (Walderdorff et al., 2018). Le LPS et le PGN sont des activateurs immunitaires très différents. Ils font cependant tous les deux parties intégrantes de la paroi cellulaire et sont connus pour déclencher la phagocytose, ainsi que d'autres réponses immunitaires telles que la production de PAM. Le LPS se trouve en abondance dans les bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli* (*E. coli*) et déclenche la voie de signalisation Imd qui est impliquée dans la phagocytose de ces bactéries Gram négatives. En revanche, PGN se trouve en abondance dans les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). La phagocytose des bactéries à Gram positif et des champignons est souvent initiée par l'activation de la voie Toll, qui est déclenchée par le PGN.

Sur la base de leurs résultats, Walderdorff et al. 2018 ont émis l'hypothèse qu'IMI pouvait être en mesure d'inhiber des éléments de la voie de l'Imd, ce qui a entraîné une réduction de l'activité phagocytaire. Dans la présente étude, la présence de PGN pendant l'exposition à IMI et/ou à ACE a entraîné une réponse phagocytaire plus forte de la part des hémocytes de drosophile, mais une réduction significative de la phagocytose chez les abeilles et les bourdons. Il est donc probable que IMI et ACE,

en présence d'une infection bactérienne à Gram positif, aient un effet modulateur sur la voie de signalisation Toll chez *Drosophila melanogaster* différent de celui observé chez les abeilles et les bourdons.

Ces résultats montrent aussi les limites de *Drosophila melanogaster* en tant que modèle écotoxicologique représentatif des insectes, en particulier les pollinisateurs, pour les études comparatives. Ceci est illustré par les différences quant à la qualité de la réponse immunitaire entre *Drosophila melanogaster* et les espèces de pollinisateurs étudiés ici, notamment en ce qui concerne l'impact des pesticides et des pathogènes sur la phagocytose.

3.3 Impact des néonicotinoïdes (IMI, ACE) sur H₂O₂

La concentration de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) produit à la suite d'une activation immunitaire et d'une exposition simultanée à des néonicotinoïdes pendant 3 heures a été mesurée dans des hémocytes de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*.

3.3.1 *Drosophila melanogaster*

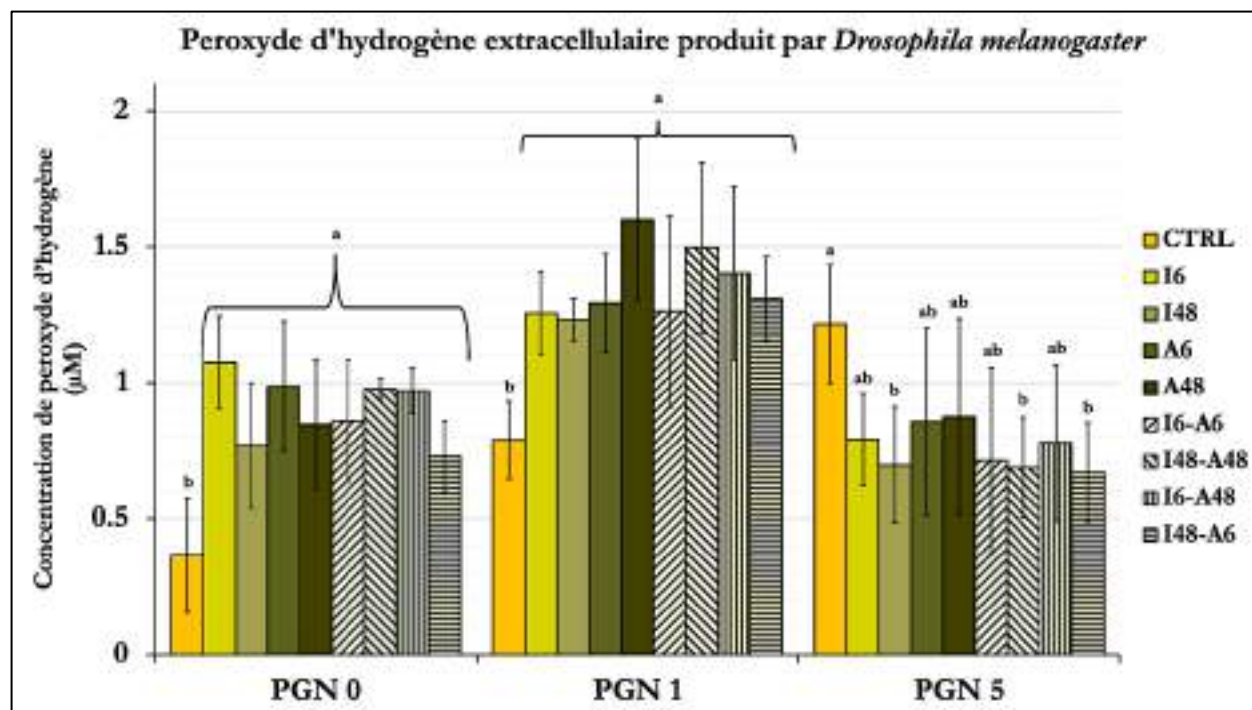


Figure 28 : Production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) chez *Drosophila melanogaster* mesurée après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Les hémocytes de *Drosophila melanogaster* sont significativement affectés par IMI et ACE quels que soient les concentrations de néonicotinoïdes, peptidoglycane et leurs combinaisons (Figure 28). Les cellules qui n'ont pas été stimulées par PGN et qui n'ont été exposées à aucun pesticide (témoins) produisent $0,366 \mu M$ de peroxyde d'hydrogène. Lors de l'exposition aux pesticides uniquement, la production de H_2O_2 augmente nettement. Avec des doses singulières d'IMI ou d'ACE (I6 et A6), les cellules produisent respectivement $1,07 \mu M$ (+65%) et $0,99 \mu M$ (+63%) de H_2O_2 . Lorsque l'exposition augmente à $48 \mu g/mL$ (I48 et A48), cette production réduit à $0,77 \mu M$ (+52%) et $0,85 \mu M$ (+57%), respectivement, en restant significativement supérieure à celle du groupe témoin même s'il n'y a pas une différence entre elles. Les mélanges d'IMI et d'ACE stimulent également une production plus élevée de peroxyde d'hydrogène. Les deux cocktails contenant la plus forte concentration

d'ACE (I48-A48 et I6-A48) ont un effet comparable aux doses singulières d'IMI et d'ACE mentionnées ci-dessus (I6 et A6), produisant environ 0,97 μM (+62 %).

Lorsque les cellules sont stimulées uniquement par 1 $\mu\text{g/mL}$ de PGN, la production de H_2O_2 est multipliée par deux pour atteindre 0,7 μM (+50 %) par rapport aux cellules qui n'avaient pas été stimulées (PGN 0). Cela indique une activation cellulaire induite significative et illustre l'efficacité du peptidoglycane en tant qu'activateur immunitaire. Cette production est ensuite significativement augmentée lorsque les cellules sont exposées à l'une des huit concentrations de néonicotinoïdes. Après exposition à des doses d'IMI ou d'ACE seuls, les cellules produisent environ 1,25 μM (+44%) de H_2O_2 , à l'exception de l'A48 qui a un impact beaucoup plus fort que les cocktails, puisque les cellules produisent 1,6 μM (+56%) de H_2O_2 et d'environ 1,5 μM (+53%) pour les mélanges de pesticides. Les résultats entre les doses ne sont pas significativement différents.

Il est intéressant de noter qu'après l'administration d'une dose plus forte d'activateur immunitaire (PGN 5), la production de peroxyde d'hydrogène a diminué, et de manière particulièrement significative lors de l'exposition à une dose élevée d'IMI, bien que les résultats ne soient pas différents entre eux. Les cellules du groupe témoin produisent 1,21 μM de H_2O_2 . En comparaison, les cellules exposées à une forte dose d'IMI, soit en une seule fois (I48), soit dans le cadre d'un cocktail (I48-A48 et I48-A6), ont produit 44% moins, soit 0,69 μM , 0,68 μM et 0,67 μM , respectivement.

3.3.2 *Apis mellifera*

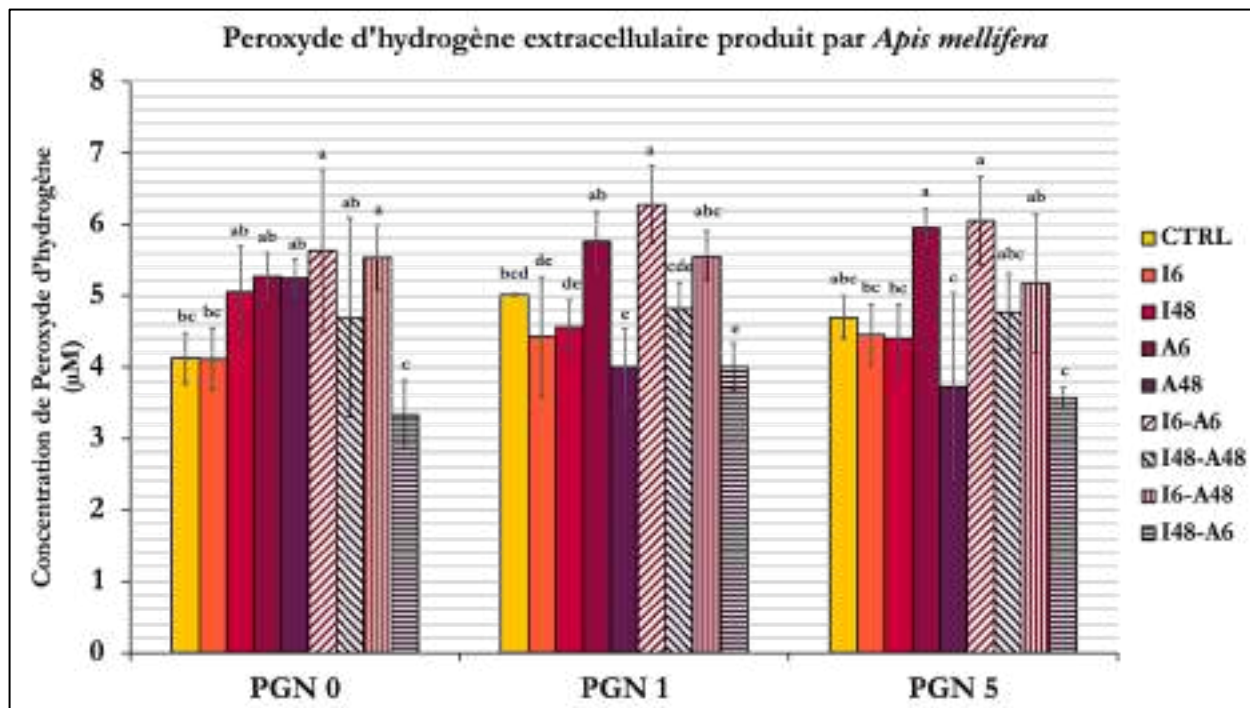


Figure 29 : Production de peroxyde d'hydrogène chez *Apis mellifera* mesuré après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Des variations significatives ont été observées pour les hémocytes d'abeilles traités avec des mélanges de cocktails dans les trois groupes de PGN (0, 1 et 5). Les cellules qui n'ont pas été soumises à un défi immunitaire (PGN 0) mais qui ont été exposées à des pesticides ne montrent un effet marqué que lorsqu'elles sont exposées à des cocktails de I6-A6, I6-A48 et I48-A6 (Figure 29). Le groupe témoin (PGN 0, IMI 0, ACE 0) produit 4,13 µM de H₂O₂. En comparaison, les cocktails I6-A6 et I6-A48 augmentent la production d'H₂O₂ jusqu'à 5,63 µM et 5,54 µM, soit une augmentation de 30 %, tandis que I48-A6 a diminué la production de 20 % à 3,33 µM. Ce dernier, bien qu'il ne soit pas significatif par rapport au contrôle, est le seul cocktail à réduire la production de H₂O₂ dans les hémocytes d'abeilles, une tendance observée avec les trois traitements PGN.

Avec une activation immunitaire modérée (PGN 1), deux des quatre cocktails ont un effet significatif sur la production de H_2O_2 . Les cellules exposées à I6-A6 produisent 25% de H_2O_2 en plus (6,27 μM) par rapport au contrôle (5,01 μM), tandis que I48-A6 diminue la production de 20% (4,0 μM). Par ailleurs, A48 diminue également la production de 20% par rapport au contrôle. L'effet du cocktail I48-A6 peut donc être comparé à une dose unique d'A48, les deux conditions supprimant de manière similaire la production dans les cellules soumises à un défi immunologique.

Bien qu'aucun changement significatif n'ait été observé dans les conditions testées par rapport au contrôle (4,7 μM) dans les hémocytes stimulés avec 5 $\mu g/mL$ de PGN, une variation significative est observée entre les expositions individuelles à l'ACE et aux mélanges. L'ACE à faible dose (A6) se comporte de manière similaire à I6-A6, les deux conditions induisant 6,0 μM de H_2O_2 soit 33 % de plus que I48-A6 et A48 seuls. I48-A6 et A48 seuls provoquent aussi la production de 3,6 μM de H_2O_2 chacun.

Les co-expositions d'IMI et d'ACE sont généralement assez puissantes pour avoir un effet sur les hémocytes d'abeilles. Toutefois, cet effet diminue sensiblement avec l'augmentation de la stimulation immunitaire par le PGN, car aucun effet significatif différent du contrôle n'est observé dans les cellules exposées à 5 $\mu g/mL$ de PGN. Par ailleurs, dans un cocktail avec l'ACE, l'IMI se comporte de manière synergique à des doses plus faibles et de manière antagoniste à des doses plus élevées, bien que cela soit réduit lorsque les cellules sont de plus en plus stimulées par le PGN. Avec le PGN 0, les cocktails contenant 6 $\mu g/mL$ d'IMI ont amplifié les effets de l'ACE, comme en témoignent I6-A6 et I6-A48, tandis que I48-A6 a induit des concentrations significativement plus faibles de H_2O_2 . Avec le PGN 1, seul I6-A6 incite les hémocytes à produire plus de H_2O_2 et I6-A48 n'a plus d'effet, tandis que I48-A6 induit de nouveau des concentrations significativement plus faibles de H_2O_2 . Avec le PGN 5, I6-A6 et I6-A48 n'ont plus d'effet sur les cellules, mais I48-A6 continue à

réduire significativement la concentration de H_2O_2 par rapport aux autres cocktails. Ceci démontre que l'augmentation du défi bactérien modifie le stress oxydatif subi par les cellules avec les cocktails contenant I6 mais pas avec ceux contenant I48.

3.3.3 *Bombus terrestris*

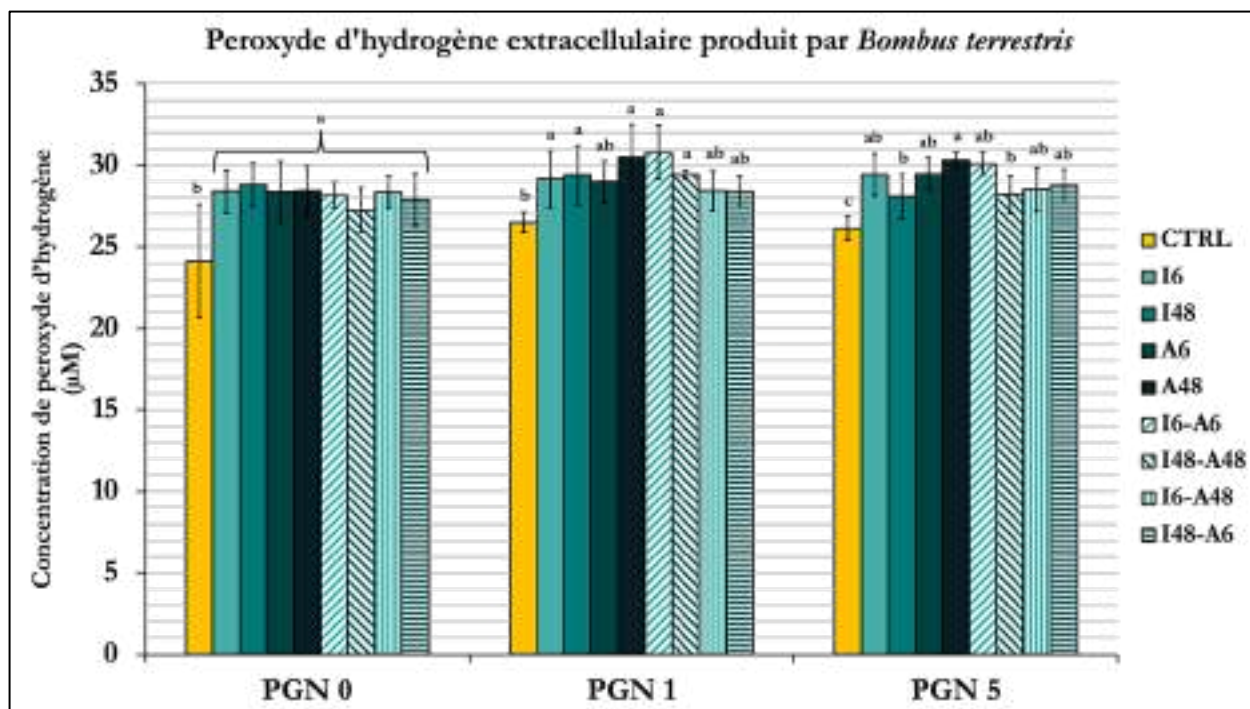


Figure 30 : Production de peroxyde d'hydrogène chez *Bombus terrestris* mesuré après exposition au peptidoglycane (PGN), à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) pendant 3 heures. Les groupes de traitement significativement différents de leur groupe de contrôle respectif sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Les hémocytes de bourdons produisent significativement plus de H_2O_2 lorsqu'ils sont exposés à toutes les concentrations testées d'IMI et d'ACE, avec ou sans activation immunitaire (Figure 30).

Sans activation immunitaire et sans exposition aux pesticides (PGN 0, IMI 0, ACE 0), les cellules produisent 24 μM de H_2O_2 . Cette production augmente jusqu'à 29 μM (+17%) lorsque l'IMI et l'ACE sont présents, seuls ou en mélange et pour toutes les concentrations testées. Cela suggère que l'imidaclopride et l'acétamipride sont des activateurs immunitaires pour les bourdons, qu'il s'agisse de doses uniques ou de

cocktails, car ils incitent les hémocytes de bourdons à produire du peroxyde d'hydrogène à des concentrations significativement plus élevées que les cellules au repos, même en l'absence de défi immunitaire.

Une tendance similaire est observée lorsque les cellules sont soumises à un défi immunitaire (PGN 1). Les cellules sont affectées par les deux concentrations d'IMI testées mais d'une façon moins importante ; I6 et I48 augmentent toutes deux la production de H_2O_2 de 10%. L'ACE à 48 $\mu g/mL$ augmente également la production de H_2O_2 de 13 %, tout comme deux des quatre cocktails contenant des parts égales d'IMI et d'ACE : I6-A6 (+13 %) et I48-A48 (+10 %).

Avec une activation immunitaire utilisant 5 $\mu g/mL$ de PGN, toutes les expositions aux pesticides stimulent une surproduction significative de H_2O_2 . Des différences significatives sont également observées entre les traitements pesticides, en particulier avec I48, I48-A48 et A48. A48 stimule une production beaucoup plus élevée, indiquant une relation antagoniste entre ACE et IMI en présence de PGN, où IMI limite les effets d'ACE.

IMI et ACE dérégulent le système de ROS en perturbant la production et régulation de peroxyde d'hydrogène chez les abeilles et les bourdons

La production de H_2O_2 est importante pour éliminer les infections bactériennes et virales au sein de l'organisme (Bayr, 2005; Evans et al., 2006; Feldhaar & Gross, 2008). Il est important de noter que les ROS et les RNS sont souvent des armes à double tranchant car leur présence, bien que bactéricide, entraîne inévitablement des dommages cellulaires par oxydation (Felton & Summers, 1995; Rosales & Uribe-Querol, 2017). Cela nécessite le maintien d'un équilibre de concentration délicat au sein de l'organisme afin de provoquer le moins de dommages collatéraux possible. La surproduction démontrée ici, en particulier chez les bourdons, est donc inquiétante car cela signifie qu'un plus grand nombre de cellules subiraient des dommages

oxydatifs inutiles, ce qui entraînerait une plus grande mortalité cellulaire. Ce dernier est bien observé avec l'essai de la viabilité cellulaire (Figure 24c.) dont les cellules de bourdons sont démontrées le plus grand taux de mortalité cellulaire après chaque traitement de PGN, IMI et ACE. D'autre part, la suppression de la production d' H_2O_2 lors d'une infection bactérienne, comme c'est le cas pour les hémocytes d'abeilles, compromet l'efficacité bactéricide de la réponse immunitaire et empêche l'organisme d'éliminer les pathogènes invasifs, une étape importante également liée à la phagocytose (Nazario-Toole & Wu, 2017; Rosales & Uribe-Querol, 2017).

Pour limiter la production de ROS et maintenir l'équilibre mentionné ci-dessus, les cellules d'insectes utilisent un mécanisme de rétroaction négative, principalement par l'intermédiaire d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et les peroxydases (POD) (Felton & Summers, 1995). Comme observé précédemment, la plupart des traitements chez les trois espèces ont entraîné une surproduction d' H_2O_2 , il est donc probable que cette boucle de rétroaction négative a été interrompue ou entravée par l'IMI ou l'ACE, ou les deux en cocktail.

En outre, Sukkar et al. (2023) ont constaté que même avec une viabilité cellulaire plus élevée, les hémocytes d'abeilles produisaient moins de H_2O_2 lorsqu'ils étaient activés par le zymosane A. Au contraire, cette étude démontre que les hémocytes d'abeilles activés par le PGN produisaient plus de H_2O_2 tout en démontrant simultanément une viabilité cellulaire élevée. Cela pourrait indiquer que les abeilles mellifères disposent de mécanismes de détoxification différents déclenchés par le PGN et le zymosane A (Sukkar et al., 2023), de sorte que les cellules réagissent différemment à des activateurs immunitaires différents.

Comme pour la plupart des toxines, c'est la dose qui fait le poison (Blacquièrre et al., 2012; Hooven et al., 2006; Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, British Columbia, Canada, 2022). Chez les abeilles, des doses singulières plus faibles d'IMI et

d'ACE n'affectent la production de H_2O_2 pour aucun des trois groupes de traitement, ce qui suggère que les doses de 6 $\mu g/mL$ d'IMI ou d'ACE seules sont trop faibles pour induire un stress oxydatif inhabituel quel que soit le niveau d'activation immunitaire chez cette espèce. Les sites de liaison des nAChR, spécifiques de l'IMI et de l'ACE, que l'on trouve également sur les hémocytes, peuvent être classés à faible ou à forte affinité. La plupart des hémocytes ont un plus grand nombre de sites de liaison à faible affinité pour les néonicotinoïdes qui ne sont activés que lors de l'exposition à des doses plus élevées, ce qui pourrait expliquer l'absence de réactivité oxydative avec de faibles doses d'IMI et d'ACE. Il est également possible que les abeilles mellifères aient un plus grand nombre d'hémocytes portant des sites de liaison à faible affinité que les bourdons ou les drosophiles.

Cette hypothèse est étayée par deux faits :

- (i) Plusieurs conditions avec des concentrations plus élevées d'IMI et d'ACE, en particulier les mélanges, induisent des productions plus élevées d' H_2O_2 chez les abeilles
- (ii) Les hémocytes d'abeilles exposés à des cocktails contenant des concentrations plus élevées d'IMI ou d'ACE (I48-A48 ; I6-A48 ; I48-A6) ont une viabilité d'au moins 2% plus élevée que le contrôle lors des essais de viabilité discutés dans la section 3.1 (Figure 24b).

Selon Martelli et al. (2020), l'imidaclopride induit la production de ROS et déclenche un stress oxydatif dans le cerveau larvaire et adulte de *Drosophila melanogaster* (Martelli et al., 2020). L'exposition chronique (1 heure) à de faibles doses d'IMI (2,5 ppm) augmente rapidement la concentration d'anion Superoxyde générée dans le cerveau des larves. Ce phénomène a été attribué à un afflux lent mais régulier de Ca^{2+} dans les neurones lorsque l'IMI se lie de manière compétitive aux nAChRs sur les membranes cellulaires, entraînant ainsi un certain nombre de conséquences : génération de ROS,

dysfonctionnement mitochondrial, mobilisation des lipides et neurodégénérescence (Martelli et al., 2020; Wei et al., 2020). De plus, ce stress oxydatif est principalement dû à des dommages mitochondriaux associés à un impact direct du flux d'ions calcium ou à une augmentation de l'expression et de l'activation de l'oxyde nitrique synthase (NOS), nécessaire à la génération de NO, et non à une augmentation de l'expression des NADPH oxydases (Martelli et al., 2020).

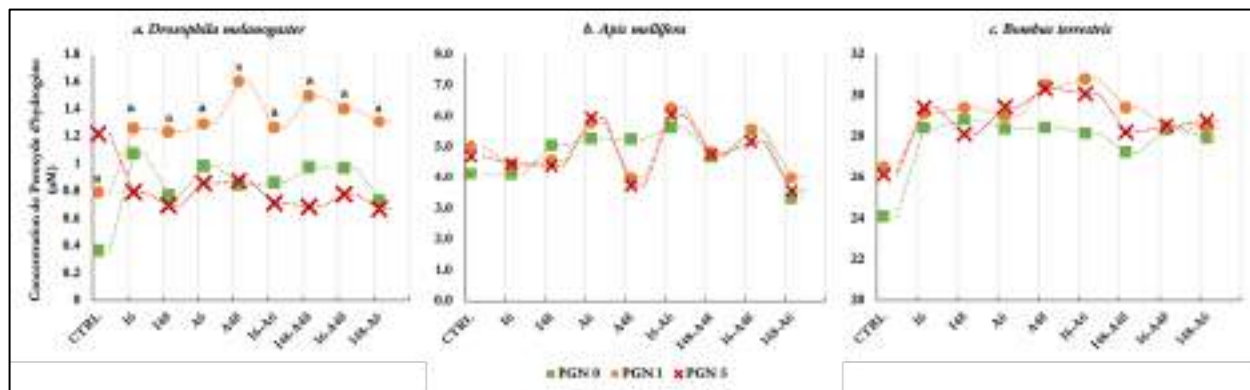


Figure 31 : Production de H_2O_2 chez *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* après traitement avec PGN et exposition aux IMI et ACE. Les groupes de traitement (PGN) significativement différents sont indiqués par les lettres différentes (ANOVA, $p < 0.05$, $n = 3$)

Les résultats de la Figure 31 confirment la différence de qualité de la réponse immunitaire des hémocytes de drosophile, d'abeilles et de bourdons (Figure 31). Les hémocytes d'abeille semblent plus affectés par les mélanges d'IMI et d'ACE (effet cocktail) alors que les hémocytes de bourdon sont sensibles à toutes les conditions testées par rapport leurs témoins, démontrant une augmentation constante de la production d' H_2O_2 . De leur côté, les hémocytes de drosophile, bien qu'également très sensibles à ces néonicotinoïdes et surtout pendant une activation immunitaire avec PGN 1, montrent des réponses différées aux mêmes doses et aux mêmes mélanges. Cela souligne la nécessité de faire preuve de prudence lors de l'extrapolation des effets des néonicotinoïdes entre les différentes espèces d'insectes.

3.4 Impact des néonicotinoïdes (IMI, ACE) sur l'expression génétique de *spaetzle* et *myD88*

L'expression génétique de *spaetzle* et de *myD88* a été mesurée par RT-PCR en deux étapes. L'ARN des cellules exposées à chaque condition a été extrait et transcrit pour obtenir de l'ADNc. Cet ADNc a ensuite été traité avec du SYBR Green (marquage fluorescent spécifique de l'ADN) et des amorces spécifiques à *spaetzle* et *myD88*, les deux gènes faisant partie intégrante de la voie de signalisation Toll. Les produits amplifiés des gènes ciblés ont été lus par PCR et comparés à des gènes de référence, afin de mesurer leur degré d'expression dans chaque condition testée.

3.4.1 *Apis mellifera*

3.4.1.1 Expression de *spaetzle* et de *myD88* à PGN 0

Dans l'ensemble (Figure 32), l'IMI et l'ACE réduisent l'expression des gènes dans les hémocytes n'ayant pas reçu de stimulation immunitaire (PGN 0), les mélanges ayant un effet plus prononcé que les doses uniques de l'un ou l'autre des pesticides testés. Une faible dose d'IMI (I6) induit une surexpression de *spaetzle* chez des hémocytes non soumis à un défi immunologique. IMI se comporte donc comme un activateur immunitaire de la voie Toll. Cependant, la même dose n'a pas d'effet sur *myD88*. À une dose plus élevée (48 µg/mL), l'IMI inhibe l'expression de *spaetzle* (Figure 32a) mais n'a pas d'effet sur l'expression de *myD88* (Figure 32b).

En revanche, les deux doses uniques d'ACE (A6 et A48) régulent à la baisse l'expression de *spaetzle* (Figure 32a) et de *myD88* (Figure 32b). L'inhibition de *spaetzle* est également observée avec les quatre mélanges. En effet, les cocktails contenant des doses plus élevées d'IMI ou d'ACE (I48-A48, I48-A6, I6-A48) entraînent une diminution plus importante de l'expression de *spaetzle*.

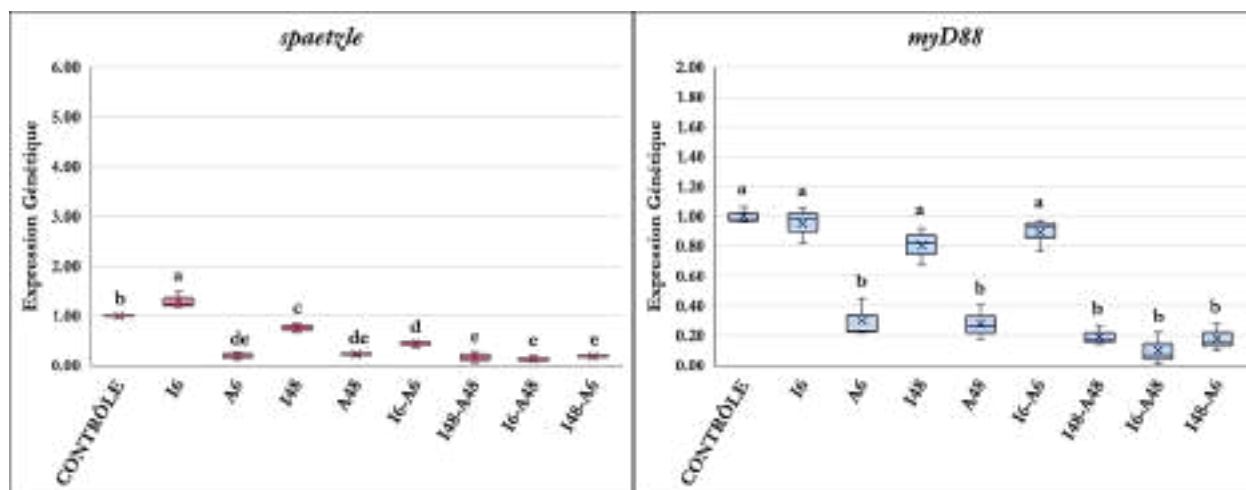


Figure 32 : Expression génétique de (a) *spaetzle* et (b) *myD88* après exposition à l'imidaclopride (I) et à l'acétamipride (A) sans activation immunitaire (0 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane (PGN 0)). Les différences significatives sont indiquées par des lettres (ANOVA, $p > 0,05$; $n=3$).

Comme pour *spaetzle*, dans les cocktails, ACE a également contré l'effet de l'IMI sur *myD88*, qui est ici significativement sous-exprimé, sauf lorsqu'il est exposé à l'I6-A6, qui ne montre pas de différence marquée dans l'expression (Figure 32b). Il est possible que l'ACE ait un effet antagoniste à l'IMI, car il dépasse l'effet moyen de l'IMI en supprimant l'expression de *spaetzle* et de *myD88*, que ce soit seul ou en mélange. Cet effet est aussi observé sur la phagocytose et la production de H_2O_2 chez les abeilles, mentionné ci-dessous, et peut confirmer l'effet antagonique de l'IMI et de l'ACE dans les mélanges.

3.4.1.2 Expression de *spaetzle* et de *myD88* à PGN 1

Stimulées conjointement par PGN 1, 48 $\mu\text{g/mL}$ d'IMI activent l'immunité (Figure 33a), induisant une surexpression de *spaetzle*. C'est le seul effet observé après exposition aux néonicotinoïdes (Figure 33a). Des doses uniques d'IMI n'ont pas d'effet sur l'expression de *myD88*. Cependant, comparées les unes aux autres, les doses d'I48 induisent une expression plus élevée de *myD88*. Toutes les expositions à l'acétamipride (seul ou dans un cocktail) induisent une diminution significative de

l'expression de *myD88* par rapport au contrôle et aux doses uniques d'IMI (Figure 33b).

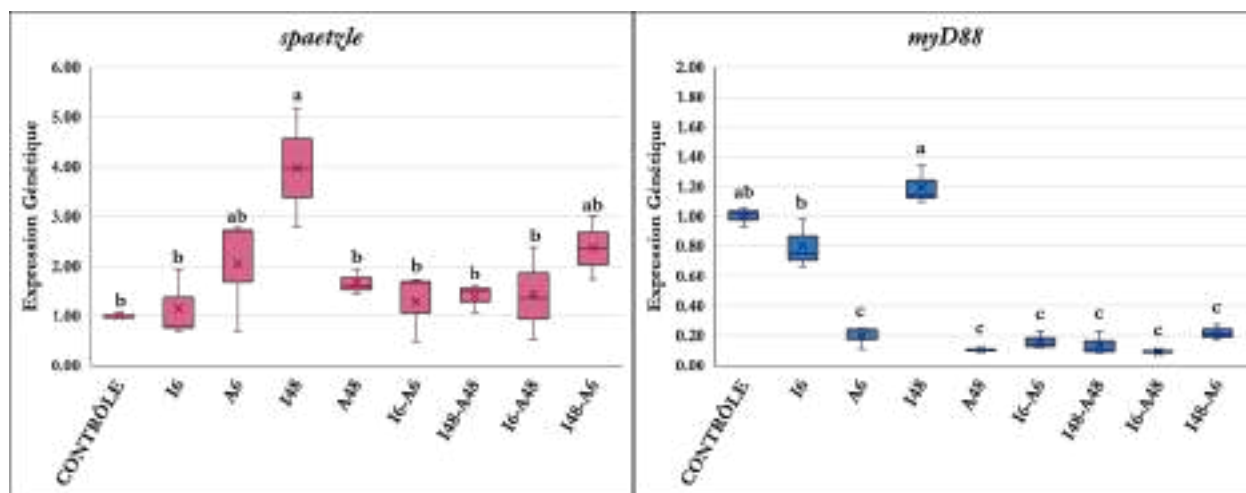


Figure 33 : Expression génétique de (a) *spaetzle* et (b) *myD88* après exposition à l'imidaclopride et à l'acétamipride avec activation immunitaire ($1 \mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane). Les différences significatives sont indiquées par des lettres ($ANOVA$, $p > 0,05$; $n=3$).

3.4.1.3 Expression de *spaetzle* et de *myD88* à PGN 5

Lorsqu'ils sont traités avec le PGN 5 (Figure 34), les deux gènes montrent une faible réponse à l'un ou l'autre des néonicotinoïdes, qu'ils soient présentés seuls ou en mélange. *spaetzle* n'est surexprimé que lorsqu'il est exposé à I48 (Figure 34a.). Cette surexpression est également observée avec *myD88* à la même concentration (Figure 34b), multipliée au moins par un facteur dix. La dose la plus faible d'IMI (I6) induit également l'expression de *myD88*, quoique moins que I48, démontrant un effet dose-dépendant. Un résultat similaire est également observé lorsqu'IMI est couplé à 6 $\mu\text{g/mL}$ d'ACE (I6-A6).

Il est intéressant de noter que, comme *spaetzle*, l'expression de *myD88* n'a pas changé de manière significative, que ce soit lors de l'exposition à l'ACE seul ou lors de l'exposition à des cocktails contenant des doses élevées. Ceci est différent de l'expression de *myD88* lorsque les cellules ont été soumises au PGN 0 ou au PGN 1 où l'ACE seul ou en mélange avec l'IMI réduit significativement l'expression de

myD88 par rapport au contrôle de chaque groupe. Vu que les deux gènes ne sont ni surexprimés ni sous-exprimés, il est possible que la concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ de PGN ait activé d'autres mécanismes de détoxification enzymatique plus rapides (SOD, CAT, GST) : les cellules redirigeraient alors leurs ressources sur un mécanisme de détoxification constitutif et réactif et non un système induit, plus lent comme la voie Toll (Daborn et al., 2012; Tauszig-Delamasure et al., 2002). En conséquence, les cellules sont beaucoup tolérantes au PGN à 5 $\mu\text{g/mL}$ qu'à 1 $\mu\text{g/mL}$. Ceci est aussi observé chez les abeilles avec la phagocytose et la production de ROS où la forte concentration de PGN à 5 $\mu\text{g/mL}$ n'a pas d'effet significatif. Ce type de tolérance à l'activateur immunitaire a aussi été observé avec LPS (Buckley et al., 2006; Sato, 2002) et avec Zymosane A (Sukkar, 2023; Sukkar et al., 2023).

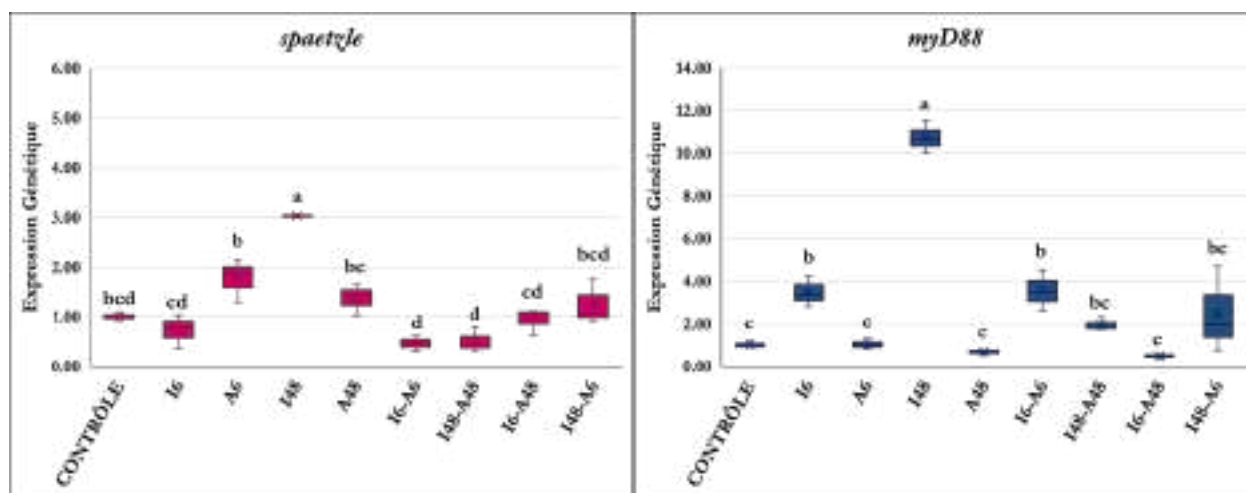


Figure 34 : Expression génétique de (a) *spaetzle* et (b) *myD88* après exposition à l'imidaclopride et à l'acétamipride avec activation immunitaire (5 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglycane). Les différences significatives sont indiquées par des lettres (ANOVA, $p > 0,05$; $n=3$).

La voie de signalisation Toll fait partie intégrante de la réponse immunitaire innée des insectes. Elle est conservée chez toutes les espèces. Le gène *spaetzle* intervient au début de la voie Toll et est responsable de la reconnaissance bactérienne (« *spaetzle* mediated bacterial recognition »). L'expression de *spaetzle* est nécessaire pour la reconnaissance des PAMP tels que le peptidoglycane, qui sont reconnus lorsqu'ils se lient au récepteur Toll et forment ensuite un dimère avec la protéine Spaetzle (codée par le gène *spaetzle*).

Composant bien caractérisé, la protéine Spaetzle n'est pas seulement responsable de l'activation de la voie de signalisation Toll : elle est également impliquée dans le développement des embryons d'insectes, en particulier dans le développement du schéma dorso-ventral des embryons de *Drosophila melanogaster* (Morisato & Anderson, 1994; D. S. Schneider et al., 1994). Chez les insectes, l'hémolymphe circule dans l'hémocoel qui est relié à ces axes dorso-ventraux. Morisato et al. (1994) ont démontré qu'une surexpression de *spaetzle* entraînait une modification de la forme normale de l'axe dorso-ventral chez les embryons de drosophile, conduisant ainsi à un risque accru de mort embryonnaire (Duneau et al., 2017; Morisato, 2001; Morisato & Anderson, 1994; D. S. Schneider et al., 1994; Stein & Stevens, 2014). De plus, des concentrations plus élevées de la protéine Spaetzle augmentent la dissociation du complexe de signalisation dimérique Toll-Spaetzle, ce qui pourrait également établir une boucle de rétroaction négative inhibant la progression de la voie de signalisation Toll (Parthier et al., 2014).

D'autre part, *myD88*, codant pour une protéine adaptatrice transductrice de signal dans la voie Toll, fait partie intégrante de la résistance aux infections bactériennes (Horng & Medzhitov, 2001; Patnaik et al., 2014; Tauszig-Delamasure et al., 2002). Tauszig-Delamasure et al. (2002) ont démontré que les drosophiles déficientes en *myD88* étaient très sensibles aux infections bactériennes et fongiques à Gram positif. Patnaik et al. (2014) ont en outre déterminé que l'absence de *myD88* chez les larves de *Tenebrio molitor* compromet la capacité de l'insecte à résister à l'infection par *S. aureus* et Horng & Medzhitov (2001) ont prouvé que le blocage de *myD88* inhibe efficacement la voie Toll et la production de *drosomycine* chez la drosophile.

Dans notre étude, l'exposition des abeilles à l'IMI et à l'ACE semble affecter la voie Toll au niveau de la reconnaissance des pathogènes (*spaetzle*) et de la transduction des signaux (*myD88*). En outre, l'effet de l'ACE semble être plus intense que celui de

l'IMI. Cependant, sa coprésence avec l'IMI et leur synergie observée montrent que les deux néonicotinoïdes peuvent avoir des effets radicaux sur l'immunité des abeilles. L'imidaclopride, seul, est un activateur immunitaire de la voie Toll à une faible concentration (6 µg/mL) dans les hémocytes qui n'ont pas encore été stimulés par le système immunitaire et à une concentration plus élevée (48 µg/mL) dans les hémocytes qui ont été soumis à un défi immunitaire. L'IMI a le même effet sur l'expression de *myD88*, qui apparaît plus en aval dans la voie Toll, mais seulement lorsque les cellules sont stimulées par 5 µg/mL de PGN. L'ACE, en revanche, est un suppresseur immunitaire, qu'il agisse seul ou dans le cadre d'un cocktail.

En l'absence d'activation immunitaire, l'ACE inhibe fortement l'expression génétique de *spatzle* et de *myD88*. Cependant, lorsque les cellules sont soumises à un défi immunitaire, cet effet est annulé pour *spatzle*, tandis que *myD88* en aval reste significativement sous-exprimé, ce qui démontre que l'exposition à l'ACE pendant une infection bactérienne comprime la capacité et la qualité de la réponse immunitaire chez les abeilles mellifères. En effet, Brandt et al. 2016 ont rapporté que les abeilles mellifères exposées aux néonicotinoïdes imidaclopride, clothianidine et thiaclopride pendant 24 heures présentaient une activité antimicrobienne significativement réduite. Indépendamment de leurs effets individuels, les cocktails d'IMI et d'ACE ont le plus souvent régulé à la baisse l'expression des deux gènes, bien que la dose plus élevée de PGN ait contrebalancé ces effets. L'IMI et l'ACE agissent donc en synergie lorsqu'ils affectent l'expression de *spatzle* et de *myD88*.

Le dérèglement de ces deux gènes chez les abeilles butineuses dû au contact avec les néonicotinoïdes est préoccupant. Faisant partie d'une voie immunitaire constitutive, *spatzle* et *myD88* sont normalement toujours exprimés à un certain degré dans les hémocytes (Weber et al., 2003). Par conséquent, la régulation à la baisse de leur expression, même en l'absence de défi immunitaire, compromet une réponse

immunitaire robuste au cas où l'abeille serait confrontée à un défi immunitaire. Alors que la réduction de l'expression de *spatzle* pourrait suggérer que l'exposition à ces deux néonicotinoïdes compromettrait la capacité des hémocytes d'abeilles à reconnaître les pathogènes et conduirait à des déformations physiques de la cavité dorso-ventrale de l'insecte, la réduction de l'expression de *myD88* pourrait entraîner une interruption complète de la transduction du signal au sein de la voie de Toll. Par conséquent, la baisse remarquable de la régulation de ce gène par les néonicotinoïdes chez *Apis mellifera* au cours d'un défi immunitaire, telle qu'observée dans cette étude, est alarmante.

En effet, lorsque l'expression réduite de *myD88* est analysée conjointement avec le test de phagocytose sur les hémocytes d'abeilles (section 3.2.2 et 3.4.1), un lien possible entre l'action des pesticides et l'infection bactérienne sur la phagocytose et l'expression des gènes émerge. La réduction significative de la phagocytose des billes de latex observée en présence de PGN peut donc être liée à la régulation à la baisse de *myD88* dans les mêmes conditions.

3.4.2 *Bombus terrestris*

Afin d'obtenir des quantités suffisantes d'ARN pour l'étude de *spatzle* et de *myD88*, les cellules doivent présenter une faible mortalité. Au cours du processus d'exposition, les cellules de bourdons ont présenté une forte mortalité, comme le montrent les tests de viabilité (section 3.1). Des débris cellulaires et une forte mélanisation ont également été observés dans les plaques d'exposition après l'incubation avec le PGN et les pesticides.

Afin d'obtenir de l'ADNc utile, soit 100 ng par puits pour la RT-PCR, et de mesurer avec précision l'expression génétique avec le SYBR Green, environ 500 ng/ μ L d'ARN utile sont nécessaires pour chaque échantillon. L'hémolymphe de bourdon fraîchement extraite et non traitée a permis de récupérer 188 ng d'ARN/ μ L (Figure

35). En revanche, les cellules de bourdons traitées avec des PGN et exposées à l'IMI et/ou à l'ACE pendant 18 heures ont donné au maximum 60 ng d'ARN/ μ L. Ces concentrations trop faibles ne permettent pas la production d'ADNc pour un traitement en aval avec SYBR Green. De plus, la qualité de l'ARN produit était également insuffisante.

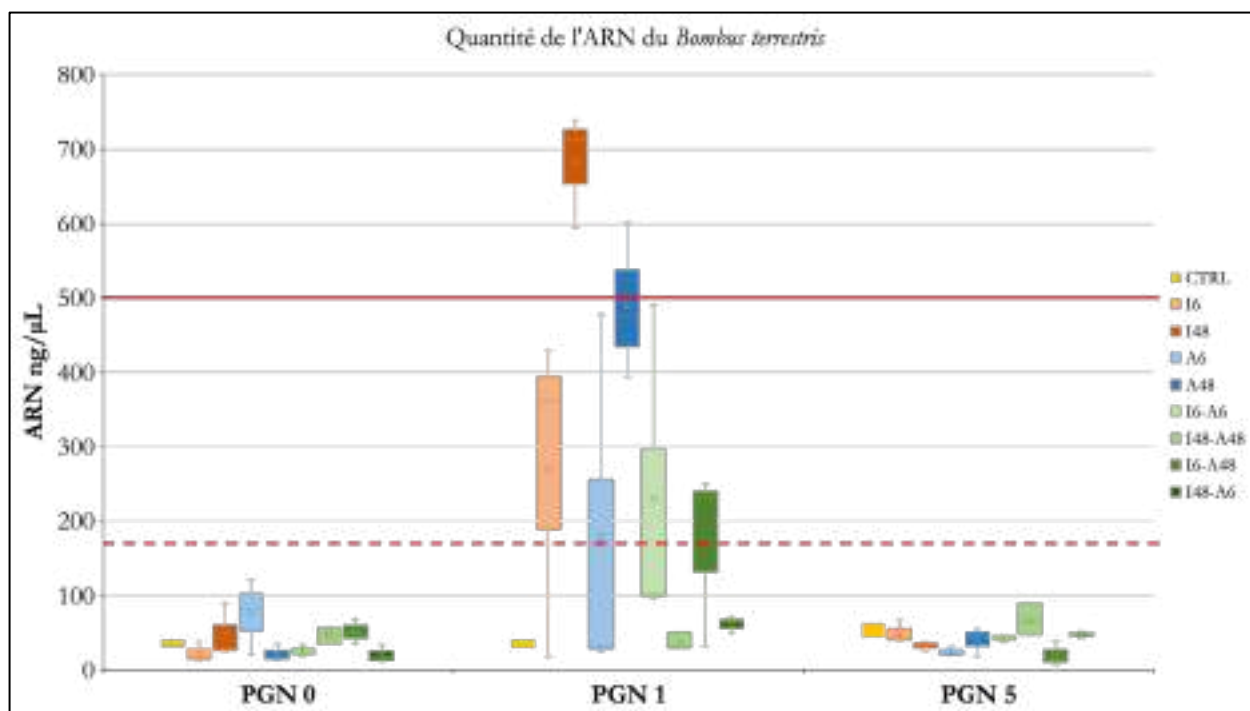


Figure 35 : Quantité de l'ARN obtenu de *Bombus terrestris* après traitement avec PGN et les néonicotinoïdes IMI et ACE pendant 18 heures. La quantité obtenue de l'hémolymphe frais et sans traitement (la ligne rouge cassé à 188 ng/ μ L) était un peu plus haute que le moyen des échantillons traités. La quantité nécessaire est environ 500 ng/ μ L (la ligne rouge continue).

La faible viabilité peut être attribuée à plusieurs facteurs :

- a. Les cellules de bourdons se dégradent et mélanisent rapidement *in vitro*.

L'hémolymphe doit donc être extraite et les cellules qu'elle contient doivent être utilisées immédiatement après collecte. Lorsque les cellules sont en suspension dans un milieu, la mélanisation est aggravée, ce qui rend difficile le maintien de l'intégrité cellulaire pour la durée des essais.

- b. Le milieu cellulaire utilisé pour les essais sur les bourdons a été initialement conçu pour les abeilles (milieu modifié WH2) (Hunter, 2010) et semble peu

approprié pour le maintien de cultures de cellules de bourdons pendant 18 heures. Bien qu'appartenant à la même famille, les abeilles et les bourdons ont des systèmes métaboliques différents et ne présentent pas la même sensibilité. La littérature actuelle, bien que riche en études *in vitro* sur les abeilles, référence peu de travaux relatifs à la culture de cellules de bourdons et aucun milieu de culture spécifique n'a, à ce jour, été référencé.

- c. Les bourdons ne sont pas domestiqués et n'ont subi aucun processus de sélection (Goulson & MacLean, 2010). Contrairement à *Apis mellifera*, ils ont montré une plus grande vulnérabilité aux pesticides et une plus grande fragilité face aux stress. Ceci est mis en évidence par la réduction de l'activité phagocytaire ainsi que par la production plus élevée de H₂O₂, deux indicateurs de stress chimique et oxydatif pour le système immunitaire et de l'organisme dans son ensemble. Ces cellules semblent avoir système de détoxification peu efficace, ce qui entraîne une plus grande mortalité cellulaire. En effet, la viabilité cellulaire n'a augmenté que lorsque les cellules ont été soumises à un défi immunitaire élevé (PGN 5) et à des cocktails de néonicotinoïdes, ce qui suggère que les infections bactériennes légères associées à l'exposition aux pesticides sont suffisamment puissantes pour empêcher une réponse immunitaire robuste tout en générant des doses significativement dommageables de ROS.
- d. La durée d'exposition des hémocytes de bourdons pourrait avoir été trop longue, ce qui a entraîné une plus grande mortalité cellulaire. Des temps d'exposition plus courts pourraient permettre d'obtenir une viabilité cellulaire plus élevée ainsi qu'un ARN de meilleure qualité et en plus grande quantité. Toutefois, cette voie n'aurait pas permis d'obtenir des résultats comparables avec ceux d'*Apis mellifera*.



DISCUSSION GÉNÉRALE



4 DISCUSSION GÉNÉRALE

4.1 Les mélanges de néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes et leurs résidus sont souvent rencontrés par les abeilles butineuses sous forme de mélanges dans les sols et les cours d'eau, dans le pollen des fleurs et même dans l'air sous forme de nuages de particules (Bonmatin et al., 2015; Goulson, 2013; Krupke et al., 2012; Simon-Delso et al., 2015). En tant que tel, l'impact des cocktails de néonicotinoïdes sur les insectes pollinisateurs doit être pris en compte et évalué afin de concevoir et d'améliorer les politiques agricoles en Europe et dans le monde (Blacqui re et al., 2012; Cheng et al., 2020; Goulson, 2013; Hernández et al., 2013). Les résultats de cette étude d emonstrent un effet négatif net des cocktails d'imidaclopride et d'acétamipride sur l'expression génétique des voies de signalisation immunitaire de l'abeille domestique et des effets sublétaux significatifs sur la phagocytose et la production de peroxyde d'hydrogène chez les abeilles domestiques et, plus particulièrement, chez les bourdons.

Les sites de liaison cibles des néonicotinoïdes sont les nAChR présents sur les cellules neuronales et non neuronales des insectes (Taillebois et al., 2018). Ces sites ne sont pas seulement spécifiques à l'IMI, à l'ACE ou à d'autres néonicotinoïdes, mais ils sont également spécifiques à l'espèce, se trouvant dans des types et des distributions variables chez les lépidoptères, les hyménoptères et les diptères (Taillebois et al., 2018). Par conséquent, l'impact de l'IMI, de l'ACE et d'autres néonicotinoïdes n'est pas seulement diff erent, il est aussi spécifique aux espèces, comme l'illustre cette étude : les bourdons et les abeilles sont des hyménoptères appartenant tous deux à la famille des Apidae, tandis que les mouches des fruits sont des diptères, pourtant, leurs réponses immunitaires ont été différemment affectées par les mêmes cocktails de néonicotinoïdes à des doses identiques. De plus, le mélange contenant de plus petites doses d'imidaclopride ou d'acétamipride (comme I6-A6, I6-A48 ou A6-I48) a eu un

effet négatif beaucoup plus important sur le système immunitaire. Ces résultats montrent que, dans le contexte environnemental actuel, les résidus de pesticides qui se retrouvent souvent sous forme de mélanges de doses aussi faibles dans l'environnement, sont à considérer au même titre que les fortes doses pour les insectes pollinisateurs (Chauzat et al., 2009; Dively & Kamel, 2012; Sanchez-Bayo & Goka, 2014) .

4.2 Les abeilles

Apis mellifera est un insecte qui joue un double rôle dans notre société, en fournissant des services de pollinisation cruciaux pour nombre de plantes à fleur et en produisant le miel utilisé dans la nutrition de nombreuses cultures depuis des millénaires (Aizen et al., 2009; Hung et al., 2018; Klein et al., 2007). Les abeilles ont été domestiquées au cours des derniers siècles (Hung et al., 2018; Klein et al., 2007). Cette sélection de certains traits biologique a entraîné une réduction de la diversité génétique au sein des sous-espèces et présente plusieurs avantages et inconvénients. Les avantages sont la création de ruches plus fortes en tant qu'unité singulière, une immunité sociale plus forte et une hiérarchie sociale plus rigide. Des ruches saines peuvent survivre à des hivers froids et vivre en tant qu'unité unique pendant des années lorsqu'elles sont bien protégées (IPBES et al., 2016). Cependant, cette faible diversité génétique a rendu l'abeille individuelle plus vulnérable aux infections et à la toxicité, comme l'ont démontré de nombreuses études à travers le monde. Bien que les ruches d'abeilles soient de grande taille, puisqu'elles contiennent plus de 60 000 abeilles, la perte d'abeilles individuelles peut être rapidement compensée si la reine est en mesure de pondre des œufs sains chaque année (Fontaine et al., 2005; IPBES et al., 2016). Cependant, des études ont montré que les néonicotinoïdes tels que l'imidaclopride et l'acétamipride ont non seulement une faible DL_{50} sur les abeilles, mais qu'ils ont également un effet négatif sur la fécondité des reines (Blacquièrre et al., 2012; Chmiel et al., 2020), compromettant ainsi la capacité des ruches à récupérer les ouvrières

perdues en raison des impacts cumulés des infections et de la toxicité des produits chimiques.

Les effets délétères observés sur les abeilles mellifères dans le cadre de cette étude jettent donc un nouvel éclairage sur l'impact des néonicotinoïdes isolés et en mélanges. Le rôle de la phagocytose chez les insectes est de tuer et d'éliminer les agents pathogènes envahissants (Mechnikov, 1908; Nazario-Toole & Wu, 2017; Rosales & Uribe-Querol, 2017). Or, la présence d'imidaclopride et d'acétamipride, que ce soit individuellement ou en mélange, compromet considérablement cette réponse immunitaire d'autant plus que l'effet est de ces pesticides et des agents pathogènes représentés par PGN ont un impact cumulatif sur les abeilles mellifères.

Si le peroxyde d'hydrogène est souvent un sous-produit des processus métaboliques au cours de la réponse immunitaire, il joue également un rôle bactéricide dans la phagocytose (Bayr, 2005; Feldhaar & Gross, 2008; Felton & Summers, 1995). Cette étude démontre que les cocktails d'imidaclopride et d'acétamipride, en l'absence d'infection bactérienne, favorisent la surproduction de peroxyde d'hydrogène. Cette surproduction conduira inévitablement à des dommages cellulaires oxydatifs. De plus, lors d'une infection bactérienne active, une forte dose d'acétamipride ou des mélanges d'imidaclopride et d'acétamipride affectent significativement la production de H_2O_2 , réduisant l'efficacité de la réponse immunitaire des abeilles. Cette étude confirme également l'impact des deux néonicotinoïdes sur *spaetzle* et *myD88* de la voie de signalisation immunitaire Toll. Ces deux gènes sont nécessaires au bon fonctionnement d'une réponse immunitaire globale aux infections bactériennes et fongiques à Gram positif. Comme ils font partie du bras constitutif du système immunitaire, les protéines qu'ils codent sont toujours présentes dans l'hémolymphe, bien que latentes (Horng & Medzhitov, 2001; Kato et al., 2023; Vasselon & Detmers, 2002). Par conséquent, la sous-expression significative et générale de ces gènes

entraîne une transcription et une production plus faibles de leurs protéines respectives, ce qui peut finalement interrompre ou compromettre l'efficacité de la voie Toll et la production de peptides antimicrobiens.

4.3 Les bourdons

Les bourdons, en raison de leur statut sauvage, sont des pollinisateurs peu étudiés dont on pense qu'ils courent un plus grand risque lié aux néonicotinoïdes (Goulson, 2010; Goulson & MacLean, 2010; IPBES et al., 2016). Ils restent non domestiqués, avec des nids plus petits voire, dans de nombreux cas, comme pollinisateurs solitaires. En fait, contrairement aux ruches d'abeilles mellifères, les ruches de bourdons sont incapables de survivre aux saisons hivernales, principalement en raison du nombre réduit d'ouvriers dans les ruches (Goulson, 2010; IPBES et al., 2016). Cela signifie que les bourdons dépendent moins de l'immunité sociale de leurs ruches que de leur immunité individuelle, ce qui les rend globalement plus vulnérables aux menaces cumulatives telles que les agents pathogènes envahissants et la toxicité des pesticides (Goulson, 2013) ainsi que la mortalité cellulaire et la production de H_2O_2 élevées et la réduction de la phagocytose observée dans les hémocytes des bourdons confrontés à un défi pesticide-pathogène dans cette étude.

En l'absence d'infection bactérienne, l'imidaclopride et l'acétamipride agissent eux-mêmes comme des activateurs immunitaires et induisent une production importante et inutile de H_2O_2 n'ayant aucun pathogène à éliminer. En cas d'infection bactérienne, cette production est à nouveau fortement accrue. Les deux scénarios conduisent à un stress oxydatif élevé et à la mort cellulaire, comme le démontre le test de viabilité. Bien que l' H_2O_2 soit un bactéricide produit pendant la phagocytose, la capacité phagocytaire réduite des hémocytes de bourdons dans ces mêmes conditions met en évidence la compétence compromise des deux réponses immunitaires. Par conséquent, même si les cellules produisent plus de H_2O_2 , le système est incapable de

phagocyter efficacement les bactéries envahissantes et d'évacuer l'hémolymphe si nécessaire. De plus la viabilité des hémocytes augmente lorsqu'ils sont soumis à un défi bactérien et à des cocktails d'imidaclopride combiné à l'acétamipride. Il s'agit d'un indicateur de la menace cytotoxique accrue posée par de telles conditions environnementales ; les hémocytes des bourdons semblent être poussés à mettre en place une réponse immunitaire plus forte pour survivre à des conditions perçues comme difficiles, en détournant plus d'énergie et de ressources pour rester en vie. En comparaison, en cas d'infections plus légères ou d'absence d'infection, et lorsqu'elles sont exposées aux néonicotinoïdes, les cellules ne sont pas en mesure de réagir en conséquence et subissent donc les effets létaux et sublétaux démontrés ici.

4.4 Les essais *in vitro* et les études de larves

Il est important de noter que les résultats de cette étude sont basés sur des hémocytes de larves d'abeilles ou de bourdons. Comme Marringa et al., 2014; Moyetta et al., 2021; Richardson et al., 2018 l'ont montré, les types et le nombre d'hémocytes chez les abeilles et les bourdons varient en fonction des stades de la vie, du sexe et des castes. Par conséquent, d'autres études sont nécessaires pour évaluer l'impact cumulatif des mêmes mélanges démontrés ici sur les hémocytes des abeilles au stade nymphal et adulte, des abeilles femelles, des abeilles mâles et des reines. L'expression génétique réduite de *spaetzle* et de *myD88* dans les hémocytes des larves d'abeilles, par exemple, peut être différente d'un stade de vie à l'autre. Bien que ces deux gènes soient principalement liés au système immunitaire, leurs fonctions au sein de l'insecte évoluent en suivant la croissance de la larve, jouant un rôle dans le développement de la physiologie des larves d'insectes et des adultes (Pendar et al., 2019).



CONCLUSION & PERSPECTIVES



5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le déclin rapide et inquiétant des populations de pollinisateurs, en particulier des abeilles domestiques et des bourdons, a jusqu'à présent été associé à de multiples facteurs de stress, y compris les effets cumulés des pathogènes et des pesticides (Beaumelle et al., 2023; Bonmatin et al., 2015; Goulson et al., 2015; Van Klink et al., 2020). Les néonicotinoïdes tels que l'imidaclopride et l'acétamipride ont été fortement impliqués dans ce paradigme, en raison de leur mode d'action systémique qui cible le récepteur spécifique de la nicotine-acétylcholine (nAChR) présent sur les cellules neuronales et non neuronales de tous les insectes (Laurino et al., 2011; Taillebois et al., 2018). Leurs résidus ont été trouvés dans le pollen, le miel, le nectar et le pain de pollen dans les ruches, ainsi que dans le sol, les cours d'eau, les systèmes végétaux et même dans l'air sous forme de poussière (Bonmatin et al., 2015; Chauzat et al., 2009; Dively & Kamel, 2012; Sanchez-Bayo & Goka, 2014). En outre, leurs effets létaux et sublétaux ont été signalés et examinés de plus en plus fréquemment dans la littérature (Aliouane et al., 2009; Doublet et al., 2015; Mengoni Goñalons & Farina, 2015; Pereira et al., 2020; M.-C. Wu et al., 2017). Parmi les sept néonicotinoïdes actuellement sur le marché, l'imidaclopride est considéré comme le plus toxique pour les abeilles, suivi du thiaméthoxame et de l'acétamipride, avec des DL_{50} allant de 8 $\mu\text{g}/\text{abeille}$ à 800 $\mu\text{g}/\text{abeille}$ (Arain et al., 2014; Casida, 2018; Iwasa et al., 2004; Marletto et al., 2003; Sanchez-Bayo & Goka, 2014; Switzer & Combes, 2016) (Annexe I).

Parmi les nombreux effets sublétaux signalés, la perte de la fonction immunitaire, de la capacité de butinage et de la fécondité est préoccupante, car elle s'est avérée préjudiciable aux populations d'abeilles gérées et sauvages (Aliouane et al., 2009; Bartling et al., 2021; Doublet et al., 2015; El Hassani et al., 2008; Feltham et al., 2014; Mason et al., 2013; Muth & Leonard, 2019). Ces effets ont été notablement observés

au sein de la population d'abeilles mellifères, comme en témoigne le syndrome d'effondrement des colonies (CCD) qui a débuté au milieu des années quatre-vingt-dix. L'impact des néonicotinoïdes, bien que fréquemment étudié, n'est pas encore parfaitement compris, en particulier en ce qui concerne l'effet des cocktails (mélanges) et leur effet cumulatif en cas d'infection bactérienne ou fongique (Bonmatin et al., 2015; Cheng et al., 2020; Simon-Delso et al., 2015).

Cette étude rapporte les effets aigus de l'imidaclopride (IMI) et de l'acétamipride (ACE), individuellement et en mélange, avec ou sans activation immunitaire, sur de multiples réponses immunitaires dans les cellules Schenider-2 de *Drosophila melanogaster* (Diptères) et dans les hémocytes fraîchement extraits d'*Apis mellifera* et de *Bombus terrestris* (Hyménoptères). L'activation immunitaire a été réalisée à l'aide de peptidoglycane (PGN) de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), un composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives. La viabilité cellulaire, la qualité de la phagocytose, la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le degré d'expression génétique de *spaetzle* et *myD88*, deux gènes immunitaires de la voie Toll, ont été observés et analysés au niveau cellulaire après des expositions de 3 heures, 18 heures ou 24 heures.

L'étude a montré que l'impact de l'imidaclopride et de l'acétamipride, avec ou sans activation immunitaire, est principalement spécifique à l'espèce. Les hémocytes de bourdons se sont révélés les plus sensibles à toutes les conditions de traitement, en particulier en ce qui concerne la phagocytose et la production de H_2O_2 . La phagocytose a été significativement compromise lorsque les cellules ont été soumises à un défi immunitaire. Les cellules de bourdons ont également produit des concentrations significativement plus importantes de H_2O_2 après tous les traitements au peptidoglycane et toutes les expositions aux pesticides. En outre, elles ont également montré la mortalité la plus élevée dans toutes les conditions de traitement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En revanche, les hémocytes d'abeilles ont mieux résisté à l'exposition aux pesticides en l'absence de défi immunitaire et avec des doses plus élevées de PGN (5 µg/mL). La capacité de phagocyter a cependant été significativement réduite avec un défi immunitaire de 1 µg/mL. La production de H₂O₂ à la suite d'une exposition aux pesticides a également varié, l'impact étant plus important lorsqu'il n'y avait pas d'activation immunitaire ou lorsque les cellules étaient exposées à 1 µg/mL de PGN. Par ailleurs, les hémocytes de *Drosophila melanogaster* ont montré le moins de changement dans la qualité des réponses immunitaires, bien que leur capacité à phagocyter et la concentration de H₂O₂ produite aient augmenté de manière significative après certaines expositions aux pesticides au cours d'une infection bactérienne.

Cette réponse spécifique à l'IMI et à l'ACE est due à des différences dans les voies métaboliques et de détoxification de chaque organisme (Iwasa et al., 2004) . Ceci est clairement observé par la grande différence entre la qualité des réponses immunitaires montrées par le diptère *Drosophila melanogaster* par rapport à l'hyménoptère *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*, lorsqu'ils sont soumis aux mêmes conditions. En outre, ces résultats sont conformes à ceux de Sukkar et al., 2023, où des effets spécifiques de l'imidaclopride et de l'amitraze ont également été observés chez *Apis mellifera* (hyménoptère), *Drosophila melanogaster* (diptère) et *Mamestra brassicae* (lépidoptère) à la suite d'une infection fongique simulée par le Zymosane-A. Ces différences dans la détoxification et les voies métaboliques pourraient être attribuées au degré de domesticité des populations d'abeilles, les abeilles mellifères étant domestiquées depuis plusieurs siècles alors que les bourdons restent des pollinisateurs sauvages. L'immunité sociale découlant de cette domesticité pourrait donc jouer un rôle important dans la qualité de la réponse immunitaire mise en place à la suite d'une exposition aux pesticides et d'une invasion de pathogènes (Chadwick et al., 2021; Goulson, 2010, 2013; Goulson et al., 2015). Les cultures cellulaires de la lignée

Schneider-2 sont robustes et résistantes aux stimuli chimiques, comme en témoigne leur viabilité élevée après exposition aux traitements (Daborn et al., 2012; Echalié, 2018; I. Schneider, 1972).

Dans notre étude, les hémocytes de *Drosophila melanogaster* ont souvent eu une réaction opposée à celle des hémocytes d'abeilles et de bourdons. La phagocytose était régulée à la hausse chez *D. melanogaster* alors qu'elle était inhibée chez les abeilles et les bourdons. La même tendance a été observée pour la production de H_2O_2 . Actuellement, *Drosophila melanogaster* est souvent utilisée comme insecte modèle où les résultats des études *in vitro* et *in vivo* sont souvent extrapolés pour expliquer les effets et les comportements des produits chimiques et des agents pathogènes sur d'autres modèles d'insectes (Charpentier et al., 2014; Fernández-Moreno et al., 2007; S.-H. Kim & Lee, 2014). Cependant, il est clair que ces comparaisons doivent être faites avec prudence, car les espèces ont tendance à réagir différemment aux mêmes stimuli.

L'étude a également révélé que les mélanges d'imidaclopride et d'acétamipride ont un effet plus toxique sur les hémocytes des abeilles et des bourdons que les expositions individuelles à l'un ou l'autre de ces composés. En outre, lorsque les abeilles sont exposées à l'imidaclopride et à l'acétamipride sous forme de mélanges, leur effet est délétère sur plusieurs fonctions immunitaires dont la phagocytose chez les bourdons et les abeilles ainsi que la production d' H_2O_2 , en particulier chez les bourdons. Cela est dû en grande partie à l'interférence des métabolites sur les voies de détoxification utilisées pour dégrader simultanément l'imidaclopride et l'acétamipride. Comme leurs métabolites respectifs ont des groupes fonctionnels différents, il est probable que leur présence interfère et interrompe plusieurs étapes métaboliques (Iwasa et al., 2004; Sukkar, Laval-Gilly, et al., 2023). Malheureusement, le devenir et l'impact des métabolites des néonicotinoïdes sont actuellement peu étudiés. Pourtant, ces résultats font partie intégrante de la compréhension de l'impact des néonicotinoïdes sur les

espèces de pollinisateurs. En effet, les pollinisateurs rencontrent souvent des mélanges de pesticides lorsqu'ils butinent (Bonmatin et al., 2015; Krupke et al., 2012; Mason et al., 2013).

L'impact cumulatif des pesticides pathogènes sur le système immunitaire des pollinisateurs a également été confirmé dans cette étude (Doublet et al., 2015; Grassl et al., 2018). La phagocytose chez les abeilles mellifères est significativement compromise par l'imidaclopride et l'acétamipride, seuls ou sous forme de cocktails, uniquement lorsque les hémocytes reçoivent un défi immunitaire avec 1 µg/ml de PGN. Les hémocytes des bourdons ont également montré une réduction significative de la phagocytose lorsque les cellules ont été exposées à 1 µg/ml ou 5 µg/ml de PGN et simultanément à l'imidaclopride et/ou à l'acétamipride. Ces effets toxiques n'ont, en revanche, pas été observés en l'absence de stimulation immunitaire. Cela confirme que les hémocytes d'abeilles soumis à un défi immunitaire et exposés simultanément à l'imidaclopride et à l'acétamipride sont incapables de phagocyter efficacement.

Enfin, la structure chimique différente de l'imidaclopride et de l'acétamipride a probablement joué un rôle dans leur impact sur la réponse immunitaire des insectes. Dans la classe des néonicotinoïdes, il existe deux sous-groupes spécifiques basés sur le groupe de liaison actif : les nitroimines (NO), comme l'imidaclopride, et les cyanoimines (CN), comme l'acétamipride (Iwasa et al., 2004; Tomizawa & Casida, 2001). Le devenir métabolique de ces deux sous-groupes distincts de néonicotinoïdes est significativement différent. Par conséquent, leur impact individuel sur la physiologie des insectes est également différent. Les métabolites de l'imidaclopride s'avèrent plus toxiques que ceux de l'acétamipride (Iwasa et al., 2004). Cette distinction doit donc être prise en considération lors de l'étude de l'impact de l'un ou l'autre néonicotinoïde sur les insectes. Néanmoins, l'étude présentée ici a montré que l'acétamipride et l'imidaclopride sont tous deux des activateurs immunitaires à de

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

faibles doses (6 µg/mL) et qu'ils représentent individuellement une menace toxique importante pour les abeilles et les bourdons à des doses plus élevées (48 µg/mL), avec ou sans stimulation immunitaire. En outre, l'expression génétique de *spaetzle* et de *myD88* chez l'abeille mellifère a été significativement dérégulée dans les trois groupes de traitement de PGN et en particulier avec l'acétamipride ou les cocktails contenant de l'acétamipride. Les structures chimiquement distinctes au sein de la classe des néonicotinoïdes doivent donc être étudiées plus avant, afin de mieux comprendre l'impact de ces pesticides populaires sur les pollinisateurs du monde entier.

Cette étude peut être enrichir avec plusieurs études sur les autres réponses immunitaires : l'impact de néonicotinoïdes non seulement sur la melanisation de l'hémolymph des abeilles et des bourdons, mais aussi sur le système de défense antioxydante (la production des espèces réactives) et es autres voies de signalisation tels que Imd et JAK/STAT. À noter que les ingrédients inertes peuvent être aussi étudié afin de mieux comprendre leur implication et leur impact sur le métabolisme.

Au niveau de la population de pollinisateurs et aussi de l'environnement, les travaux de recherche spécifiques aux espèces et genres différentes (*Bombus*, *Osmia*, *Danuss*) qui sont déjà plus vulnérables et moins étudiés, semble pertinent et nécessaires dans le contexte environnemental actuel. Les études similaires sur les organismes aquatique (les amphibiens) peuvent aussi contribués aux données manquant.



RÉFÉRENCES



RÉFÉRENCES

- Abbo, P. M., Kawasaki, J. K., Hamilton, M., Cook, S. C., DeGrandi-Hoffman, G., Li, W. F., Liu, J., & Chen, Y. P. (2017). Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*: Survival and health of European honey bees. *Insect Science*, 24(3), 467–477. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12335>
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*, 103(9), 1579–1588. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp076>
- Albrecht, W. (2020). Which concentrations are optimal for in vitro testing? *EXCLI Journal*; 19:Doc1172; ISSN 1611-2156. <https://doi.org/10.17179/EXCLI2020-2761>
- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., & Gauthier, M. (2009). SUBCHRONIC EXPOSURE OF HONEYBEES TO SUBLETHAL DOSES OF PESTICIDES: EFFECTS ON BEHAVIOR. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1), 113. <https://doi.org/10.1897/08-110.1>
- Allsopp, M. H., De Lange, W. J., & Veldtman, R. (2008). Valuing Insect Pollination Services with Cost of Replacement. *PLoS ONE*, 3(9), e3128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003128>
- Arain, M. S., Hu, X.-X., & Li, G.-Q. (2014). Assessment of Toxicity and Potential Risk of Butene-fipronil Using *Drosophila melanogaster*, in Comparison to Nine Conventional Insecticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92(2), 190–195. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1155-8>
- Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. D. J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, 49(5), 562–572. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0583-1>

RÉFÉRENCES

- Bartling, M. T., Thümecke, S., Russert, J. H., Vilcinskas, A., & Lee, K.-Z. (2021). Exposure to low doses of pesticides induces an immune response and the production of nitric oxide in honeybees. *Scientific Reports*, 11(1), 6819. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86293-0>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species: *Critical Care Medicine*, 33(Suppl), S498–S501. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>
- Beaumelle, L., Tison, L., Eisenhauer, N., Hines, J., Malladi, S., Pelosi, C., Thouvenot, L., & Phillips, H. R. P. (2023). Pesticide effects on soil fauna communities—A meta-analysis. *Journal of Applied Ecology*, 60(7), 1239–1253. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14437>
- Bird, G., Wilson, A. E., Williams, G. R., & Hardy, N. B. (2021). Parasites and pesticides act antagonistically on honey bee health. *Journal of Applied Ecology*, 58(5), 997–1005. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13811>
- Blacquière, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N., & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 35–67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
- Boots, M., & Best, A. (2018). The evolution of constitutive and induced defences to infectious disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1883), 20180658. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0658>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the

RÉFÉRENCES

- immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>
- Brookman, J. L., Ratcliffe, N. A., & Rowley, A. F. (1989). Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochemistry*, 19(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(89\)90008-5](https://doi.org/10.1016/0020-1790(89)90008-5)
- Buckley, J. M., Wang, J. H., & Redmond, H. P. (2006). Cellular reprogramming by gram-positive bacterial components: A review. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4), 731–741. <https://doi.org/10.1189/jlb.0506312>
- Carvalho, L., Jacinto, A., & Matova, N. (2014). The Toll/NF- κ B signaling pathway is required for epidermal wound repair in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(50), E5373–E5382. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408224111>
- Casida, J. E. (2018). Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 125–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>
- Chadwick, F., Alton, S., Tennant, E. S., Fitzmaurice, B., & Earl, J. (2021). *Le petit Larousse des abeilles et de l'apiculture* (Nouvelle éd.). Larousse.
- Chaplin-Kramer, R., Dombeck, E., Gerber, J., Knuth, K. A., Mueller, N. D., Mueller, M., Ziv, G., & Klein, A.-M. (2014). Global malnutrition overlaps with pollinator-dependent micronutrient production. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1794), 20141799. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1799>
- Charpentier, G., Louat, F., Bonmatin, J.-M., Marchand, P. A., Vanier, F., Locker, D., & Decoville, M. (2014). Lethal and Sublethal Effects of Imidacloprid, After Chronic Exposure, On the Insect Model *Drosophila melanogaster*. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 4096–4102. <https://doi.org/10.1021/es405331c>
- Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Madec, F., Aubert, M., & Faucon, J.-P. (2009). Influence of Pesticide Residues on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health in

RÉFÉRENCES

- France. *Environmental Entomology*, 38(3), 514–523.
<https://doi.org/10.1603/022.038.0302>
- Cheng, L., Lu, Y., Zhao, Z., Hoogenboom, R. L. A. P., Zhang, Q., Liu, X., Song, W., Guan, S., Song, W., & Rao, Q. (2020). Assessing the combined toxicity effects of three neonicotinoid pesticide mixtures on human neuroblastoma SK-N-SH and lepidopteran Sf-9 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111632.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111632>
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Burton, J. P., & Reid, G. (2019). Deleterious Effects of Neonicotinoid Pesticides on *Drosophila melanogaster* Immune Pathways. *mBio*, 10(5), e01395-19, /mbio/10/5/mBio.01395-19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01395-19>
- Chmiel, J. A., Daisley, B. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for Probiotics as Mediators of Environmental Stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 22. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00022>
- Cimino, A. M., Boyles, A. L., Thayer, K. A., & Perry, M. J. (2017). Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health: A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 155–162.
<https://doi.org/10.1289/EHP515>
- Clark, A. G., & Shamaan, N. A. (1984). Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(3), 249–261. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90018-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90018-X)
- Daborn, P. J., Lumb, C., Harrop, T. W. R., Blasetti, A., Pasricha, S., Morin, S., Mitchell, S. N., Donnelly, M. J., Müller, P., & Batterham, P. (2012). Using *Drosophila melanogaster* to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(12), 918–924.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.09.003>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

RÉFÉRENCES

- Davidson, C., Shaffer, H. B., & Jennings, M. R. (2002). Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. *Conservation Biology*, 16(6), 1588–1601. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01030.x>
- Deguine, J., & Barton, G. M. (2014). MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-97>
- Desjardins, M., & Griffiths, G. (2003). Phagocytosis: Latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), 498–503. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00083-8)
- Dively, G. P., & Kamel, A. (2012). Insecticide Residues in Pollen and Nectar of a Cucurbit Crop and Their Potential Exposure to Pollinators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4449–4456. <https://doi.org/10.1021/jf205393x>
- Dobbs, A. (1750). IV. A letter from Arthur Dobbs Esq; to Charles Stanhope Esq; F. R. S. concerning bees, and their method of gathering wax and honey,. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 46(496), 536–549. <https://doi.org/10.1098/rstl.1749.0102>
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F. A., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle: Pesticide-pathogen interactions in honey bees. *Environmental Microbiology*, 17(4), 969–983. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- Duneau, D. F., Kondolf, H. C., Im, J. H., Ortiz, G. A., Chow, C., Fox, M. A., Eugénio, A. T., Revah, J., Buchon, N., & Lazzaro, B. P. (2017). The Toll pathway underlies host sexual dimorphism in resistance to both Gram-negative and Gram-positive bacteria in mated *Drosophila*. *BMC Biology*, 15(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0466-3>
- Echalier, G. (2018). Continuous *Drosophila* Cell Lines Established In Vitro. In *Drosophila Cells in Culture* (pp. 61–80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809473-0.00003-8>

RÉFÉRENCES

- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., & Armengaud, C. (2008). Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), 653–661. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9071-8>
- Eleftherianos, I., Heryanto, C., Bassal, T., Zhang, W., Tettamanti, G., & Mohamed, A. (2021). Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*, 164(3), 401–432. <https://doi.org/10.1111/imm.13390>
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., & Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology*, 10(13), 781–784. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00569-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00569-8)
- European Food Safety Authority (EFSA). (2008). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 6(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.148r>
- European Food Safety Authority (EFSA). (2018). Peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid considering the uses as seed treatments and granules. *EFSA Journal*, 16(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5178>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Ewen-Campen, B., Yang-Zhou, D., Fernandes, V. R., González, D. P., Liu, L.-P., Tao, R., Ren, X., Sun, J., Hu, Y., Zirin, J., Mohr, S. E., Ni, J.-Q., & Perrimon, N. (2017). Optimized strategy for in vivo Cas9-activation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9409–9414. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707635114>
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, 10(9), 1082–1088. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010>

RÉFÉRENCES

- Feltham, H., Park, K., & Goulson, D. (2014). Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 23(3), 317–323. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1189-7>
- Felton, G. W., & Summers, C. B. (1995). Antioxidant systems in insects: Antioxidant Systems in Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 29(2), 187–197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>
- Fernández-Moreno, M. A., Farr, C. L., Kaguni, L. S., & Garesse, R. (2007). *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Biology. In D. Leister & J. M. Herrmann (Eds.), *Mitochondria* (Vol. 372, pp. 33–49). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_3
- Fontaine, C., Dajoz, I., Meriguet, J., & Loreau, M. (2005). Functional Diversity of Plant–Pollinator Interaction Webs Enhances the Persistence of Plant Communities. *PLoS Biology*, 4(1), e1. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040001>
- Free, J. B., Raw, A., & Williams, I. H. (1975). Pollination of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Jamaica by honeybees and wasps. *Applied Animal Ethology*, 1(3), 213–223. [https://doi.org/10.1016/0304-3762\(75\)90013-9](https://doi.org/10.1016/0304-3762(75)90013-9)
- Fu, Y. L., & Harrison, R. E. (2021). Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 12, 662063. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662063>
- Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Török, T., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Andó, I., & Kurucz, É. (2017). Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 76, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.013>
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental*

RÉFÉRENCES

- Science and Pollution Research*, 22(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Goulson, D. (2010). *Bumblebees: Behaviour, ecology, and conservation* (2nd ed). Oxford University Press.
- Goulson, D. (2013). REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Goulson, D., & MacLean, N. (2010). Bumblebees. In *Silent Summer: The State of Wildlife in Britain and Ireland*. Cambridge University Press. <https://dspace.stir.ac.uk/bitstream/1893/9129/1/Goulson-SilentSummer2010.pdf>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957–1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grant, D. F., & Matsumura, F. (1988). Glutathione S-transferase-1 in *Aedes aegypti* larvae: Purification and properties. *Insect Biochemistry*, 18(6), 615–622. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90014-5](https://doi.org/10.1016/0020-1790(88)90014-5)
- Grassl, J., Holt, S., Cremen, N., Peso, M., Hahne, D., & Baer, B. (2018). Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 159, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.005>
- Gregorc, A., Alburaki, M., Rinderer, N., Sampson, B., Knight, P. R., Karim, S., & Adamczyk, J. (2018). Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Scientific Reports*, 8(1), 15003. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33348-4>
- Gregorc, A., Evans, J. D., Scharf, M., & Ellis, J. D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1042–1049. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.03.015>

RÉFÉRENCES

- Gu, B. J., Sun, C., Fuller, S., Skarratt, K. K., Petrou, S., & Wiley, James. S. (2014). A quantitative method for measuring innate phagocytosis by human monocytes using real-time flow cytometry: Quantitate Phagocytosis. *Cytometry Part A*, 85(4), 313–321. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22400>
- Győri, J., Farkas, A., Stolyar, O., Székács, A., Mörtl, M., & Vehovszky, Á. (2017). Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. *Acta Biologica Hungarica*, 68(4), 345–357. <https://doi.org/10.1556/018.68.2017.4.1>
- Hallmann, C. A., Foppen, R. P. B., van Turnhout, C. A. M., de Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511(7509), 341–343. <https://doi.org/10.1038/nature13531>
- Hayashi, F., Means, T. K., & Luster, A. D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102(7), 2660–2669. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>
- Heinrich-Böll-Stiftung, B., Germany, Friends of the Earth Europe, B., Belgium, Bund für Umwelt und Naturschutz, B., Germany, & PAN Europe, B., Belgium. (2022). *Pesticide Atlas 2022: Facts and figures about toxic chemicals in agriculture* (1st ed.). Heinrich-Böll-Stiftung, Germany.
- Hengstler, J. G., Sjögren, A.-K., Zink, D., & Hornberg, J. J. (2020). In vitro prediction of organ toxicity: The challenges of scaling and secondary mechanisms of toxicity. *Archives of Toxicology*, 94(2), 353–356. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02669-7>
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., & López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>
- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>

RÉFÉRENCES

- Hooven, L., Sagili, R., & Johansen, E. (2006). *How to Reduce Bee Posioning from Pesticides*. Pacific Northwest Extension.
- Hornig, T., & Medzhitov, R. (2001). Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12654–12658. <https://doi.org/10.1073/pnas.231471798>
- Hung, K.-L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., & Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1870), 20172140. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>
- Hunter, W. B. (2010). Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 46(2), 83–86. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9246-x>
- IPBES, Brondízio, E. S., Settele, J., Díaz, S., & Ngo, H. T. (2019). *Global Assessment Report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services* (p. 1144). Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES). <https://doi.org/10.5281/zenodo.3402856>
- IPBES, Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Ngo, H. T. (2016). *The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production* (p. 552). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3402857>
- IUCN, I. U. for C. of N. (2001). *Biodiversity Briefs*. Brussels : European Commission; Gland : IUCN, 2001. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2001-036-3-En.pdf>
- IUCN, I. U. for C. of N. (2023, August). *The IUCN Red List of Threatened Species, Version 2023-8*. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org>
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis*

RÉFÉRENCES

- mellifera. *Crop Protection*, 23(5), 371–378.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), 175–182.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.005>
- Kanost, M. R., Jiang, H., & Yu, X.-Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198(1), 97–105.
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0121.x>
- Kato, D., Miura, K., & Yokoi, K. (2023). Analysis of the Toll and Spaetzle Genes Involved in Toll Pathway-Dependent Antimicrobial Gene Induction in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera; Tenebrionidae). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1523. <https://doi.org/10.3390/ijms24021523>
- Kaufmann, S. H. E. (2008). Immunology's foundation: The 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*, 9(7), 705–712. <https://doi.org/10.1038/ni0708-705>
- Kaufmann, S. H. E. (2019). Immunology's Coming of Age. *Frontiers in Immunology*, 10, 684. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00684>
- Kenna, D., Cooley, H., Pretelli, I., Ramos Rodrigues, A., Gill, S. D., & Gill, R. J. (2019). Pesticide exposure affects flight dynamics and reduces flight endurance in bumblebees. *Ecology and Evolution*, 9(10), 5637–5650.
<https://doi.org/10.1002/ece3.5143>
- Kim, S.-H., & Lee, W.-J. (2014). Role of DUOX in gut inflammation: Lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>
- Kim, T.-I., & Kim, Y.-J. (2005). Overview of Innate Immunity in *Drosophila*. *BMB Reports*, 38(2), 121–127. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.2.121>
- Klein, A.-M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing

RÉFÉRENCES

- landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE*, 7(1), e29268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>
- Laurino, D., PORPORATO, M., PATETTA, A., & MANINO, A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64(1), 107–113.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295–1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.-H., Caroff, M., Lee, W.-J., Mengin-Lecreulx, D., & Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology*, 4(5), 478–484. <https://doi.org/10.1038/ni922>
- Li, W., & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *Environmental Research*, 212, 113267. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267>
- Li, Z., Li, M., He, J., Zhao, X., Chaimanee, V., Huang, W.-F., Nie, H., Zhao, Y., & Su, S. (2017). Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.06.010>
- Lindsay, S. A., & Wasserman, S. A. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.011>
- Lord, K., Hoffman-Liebermann, B., & Liebermann, D. (1990). Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7), 1095–1097.

RÉFÉRENCES

- Luhur, A., Klueg, K. M., & Zelhof, A. C. (2019). Generating and working with *Drosophila* cell cultures: Current challenges and opportunities. *WIREs Developmental Biology*, 8(3), e339. <https://doi.org/10.1002/wdev.339>
- Malagoli, D., Mandrioli, M., Tascetta, F., & Ottaviani, E. (2017). Circulating phagocytes: The ancient and conserved interface between immune and neuroendocrine function: Immune and neuroendocrine functions of immunocytes. *Biological Reviews*, 92(1), 369–377. <https://doi.org/10.1111/brv.12234>
- Marletto, F., Patetta, A., & MANINO, A. (2003). Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumblebees. *Bulletin of Insectology*, 56, 155–158.
- Marringa, W. J., Krueger, M. J., Burritt, N. L., & Burritt, J. B. (2014). Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE*, 9(10), e108486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108486>
- Martelli, F., Zhongyuan, Z., Wang, J., Wong, C.-O., Karagas, N. E., Roessner, U., Rupasinghe, T., Venkatachalam, K., Perry, T., Bellen, H. J., & Batterham, P. (2020). Low doses of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce ROS triggering neurological and metabolic impairments in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(41), 25840–25850. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011828117>
- Mason, R., Tennekes, H., Sánchez-Bayo, F., & Jepsen, P. U. (2013). Immune Suppression by Neonicotinoid Insecticides at the Root of Global Wildlife Declines. *Journal of Environmental Immunology and Toxicology*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.7178/jeit.1>
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(11), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01820-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4)
- McDaniel, M., Teng, S., Sprout, E., Costa, H., Hall, H., Hunt, J., Boudreau, D., Ramroop, T., & Rutledge, K. (2023, August). Global Biodiversity. *National Geographic Society*. <https://education.nationalgeographic.org/resource/global-biodiversity/>

RÉFÉRENCES

- Mechnikov, I. (1908). Nobel Lectures: Ilya Mechnikov: On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases. In *Ilya Mechnikov: Nobel Lecture*. Elsevier Publishing Company. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/lecture/>
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>
- Melcarne, C., Lemaitre, B., & Kuran, E. (2019). Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>
- Mellroth, P., Karlsson, J., & Steiner, H. (2003). A Scavenger Function for a *Drosophila* Peptidoglycan Recognition Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7059–7064. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208900200>
- Mengoni Goñalons, C., & Farina, W. M. (2015). Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult Honeybee Behaviour. *PLOS ONE*, 10(10), e0140814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140814>
- Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation de la République Française. (2020). *Le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation annonce un plan de soutien gouvernemental à la filière betterave-sucre pour faire face à la crise de la jaunisse*. <https://agriculture.gouv.fr/filiere-betterave-sucre-plan-de-soutien-gouvernemental-pour-faire-face-la-crise-de-la-jaunisse>
- Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, British Columbia, Canada. (2022). *Pesticide Toxicity and Hazard*. Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, British Columbia, Canada. <https://www2.gov.bc.ca/assets/gov/farming-natural-resources-and-industry/agriculture-and-seafood/animal-and-crops/plant-health/pesticide-toxicity-hazard.pdf>
- Mobley, M. W., & Gegear, R. J. (2018). One size does not fit all: Caste and sex differences in the response of bumblebees (*Bombus impatiens*) to chronic oral neonicotinoid exposure. *PLOS ONE*, 13(10), e0200041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200041>

RÉFÉRENCES

- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., & Worm, B. (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, 9(8), e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Morisato, D. (2001). Spätzle regulates the shape of the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. *Development*, 128(12), 2309–2319. <https://doi.org/10.1242/dev.128.12.2309>
- Morisato, D., & Anderson, K. V. (1994). The spätzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 76(4), 677–688. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90507-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90507-X)
- Motaung, T. E. (2020). Chloronicotinyl insecticide imidacloprid: Agricultural relevance, pitfalls and emerging opportunities. *Crop Protection*, 131, 105097. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105097>
- Moyetta, N. R., Ramos, F. O., Leyria, J., Canavoso, L. E., & Fruttero, L. L. (2021). Morphological and Ultrastructural Characterization of Hemocytes in an Insect Model, the Hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Insects*, 12(7), 640. <https://doi.org/10.3390/insects12070640>
- Muth, F., & Leonard, A. S. (2019). A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees. *Scientific Reports*, 9(1), 4764. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39701-5>
- Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(6), 377–385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
- Nakamura, M., Verboon, J. M., & Parkhurst, S. M. (2017). Prepatterning by RhoGEFs governs Rho GTPase spatiotemporal dynamics during wound repair. *Journal of Cell Biology*, 216(12), 3959–3969. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704145>
- Nakayama, A., Yoshida, M., Kagawa, N., & Nagao, T. (2019). The neonicotinoids acetamiprid and imidacloprid impair neurogenesis and alter the microglial profile in the hippocampal dentate gyrus of mouse neonates. *Journal of Applied Toxicology*, 39(6), 877–887. <https://doi.org/10.1002/jat.3776>

RÉFÉRENCES

- National Geographic Society. (2022). *Biodiversity*. National Geographic Society.
<https://education.nationalgeographic.org/resource/biodiversity/>
- Nazario-Toole, A. E., & Wu, L. P. (2017). Phagocytosis in Insect Immunity. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 52, pp. 35–82). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.12.001>
- Negri, P., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2014). *Apis mellifera* haemocytes *in-vitro* , What type of cells are they? Functional analysis before and after pupal metamorphosis. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 576–589.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.11>
- Nieto, A., Roberts, S. P. M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., Biesmeijer, J. C., Bogusch, P., Dathe, H. H., De la Rúa, P., De Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Ortiz-Sánchez, F. J., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S. G., Praz, C., Quaranta, M., ... European Commission, I. (2014). *European red list of bees*. Rosseels Printing.
<https://data.europa.eu/doi/10.2779/77003>
- Ostiguy, N., Drummond, F. A., Aronstein, K., Eitzer, B., Ellis, J. D., Spivak, M., & Sheppard, W. S. (2019). Honey Bee Exposure to Pesticides: A Four-Year Nationwide Study. *Insects*, 10(1), 13. <https://doi.org/10.3390/insects10010013>
- Pamminger, T., Botías, C., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2018). A mechanistic framework to explain the immunosuppressive effects of neurotoxic pesticides on bees. *Functional Ecology*, 32(8), 1921–1930. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13119>
- Parsons, B., & Foley, E. (2016). Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 95–101.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.019>
- Parthier, C., Stelter, M., Ursel, C., Fandrich, U., Lilie, H., Breithaupt, C., & Stubbs, M. T. (2014). Structure of the Toll-Spätzle complex, a molecular hub in *Drosophila* development and innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6281–6286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320678111>

RÉFÉRENCES

- Patnaik, B. B., Patnaik, H. H., Seo, G. W., Jo, Y. H., Lee, Y. S., Lee, B. L., & Han, Y. S. (2014). Gene structure, cDNA characterization and RNAi-based functional analysis of a myeloid differentiation factor 88 homolog in *Tenebrio molitor* larvae exposed to *Staphylococcus aureus* infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(2), 208–221. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.009>
- Pendar, H., Aviles, J., Adjerid, K., Schoenewald, C., & Socha, J. J. (2019). Functional compartmentalization in the hemocoel of insects. *Scientific Reports*, 9(1), 6075. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42504-3>
- Pereira, N. C., Diniz, T. O., & Takasusuki, M. C. C. R. (2020). Sublethal effects of neonicotinoids in bees: A review. *Scientific Electronic Archives*, 13(7), 142. <https://doi.org/10.36560/13720201120>
- Petronio Petronio, G., Pietrangelo, L., Cutuli, M. A., Magnifico, I., Venditti, N., Guarnieri, A., Abate, G. A., Yewhalaw, D., Davinelli, S., & Di Marco, R. (2022). Emerging Evidence on *Tenebrio molitor* Immunity: A Focus on Gene Expression Involved in Microbial Infection for Host-Pathogen Interaction Studies. *Microorganisms*, 10(10), 1983. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101983>
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., McField, M., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Van der Sluijs, J. P., Van Dyck, H., & Wiemers, M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 68–102. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>
- Racila, D., & Bickenbach, J. R. (2009). Are epidermal stem cells unique with respect to aging? *Aging*, 1(8), 746–750. <https://doi.org/10.18632/aging.100082>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reid, R. J., Troczka, B. J., Kor, L., Randall, E., Williamson, M. S., Field, L. M., Nauen, R., Bass, C., & Davies, T. G. E. (2020). Assessing the acute toxicity of insecticides to the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris audax*). *Pesticide*

RÉFÉRENCES

- Biochemistry and Physiology*, 166, 104562.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104562>
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417–429.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Richardson, R. T., Ballinger, M. N., Qian, F., Christman, J. W., & Johnson, R. M. (2018). Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*, 49(3), 397–410.
<https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>
- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, 2017, 1–18.
<https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE*, 9(4), e94482.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- Sato, S. (2002). A variety of microbial components induce tolerance to lipopolysaccharide by differentially affecting MyD88-dependent and -independent pathways. *International Immunology*, 14(7), 783–791.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxf046>
- Schetz, J. A., & Shankar, E. P. N. (2004). Protein Expression in the *Drosophila* Schneider 2 Cell System. *Current Protocols in Neuroscience*, 27(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0416s27>
- Schneider, D. S., Jin, Y., Morisato, D., & Anderson, K. V. (1994). A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Development*, 120(5), 1243–1250. <https://doi.org/10.1242/dev.120.5.1243>
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 27(2), 353–365.

RÉFÉRENCES

- Schroeder, F., & Kinden, D. A. (1983). Measurement of phagocytosis using fluorescent latex beads. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 8(1), 15–27. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(83\)90017-9](https://doi.org/10.1016/0165-022X(83)90017-9)
- Shi, J., Zhang, R., Pei, Y., Liao, C., & Wu, X. (2020). Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. *Environmental Pollution*, 266, 115345. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115345>
- Shpigler, H., Tamarkin, M., Gruber, Y., Poleg, M., Siegel, A. J., & Bloch, G. (2013). Social influences on body size and developmental time in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 67(10), 1601–1612. <https://doi.org/10.1007/s00265-013-1571-0>
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., ... Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Stein, D. S., & Stevens, L. M. (2014). Maternal control of the *Drosophila* dorsal-ventral body axis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(5), 301–330. <https://doi.org/10.1002/wdev.138>
- Suchail, S., Debrauwer, L., & Belzunces, L. P. (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science*, 60(3), 291–296. <https://doi.org/10.1002/ps.772>
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2482–2486. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201113>

RÉFÉRENCES

- Sukkar, D. (2023). *Role of nosema cerenae and pesticides in the decline of bees: Studies using a multifactorial approach: “tipping the scale of honeybee immune responses: The effect of pesticides on immune-stimulation mimicking nosema spp.”* [Université de Lorraine]. <https://www.theses.fr/s292188>
- Sukkar, D., Kanso, A., Laval-Gilly, P., & Falla-Angel, J. (2023). A clash on the Toll pathway: Competitive action between pesticides and zymosan A on components of innate immunity in *Apis mellifera*. *Frontiers in Immunology*, 14, 1247582. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1247582>
- Sukkar, D., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Malladi, S., Azoury, S., Kanso, A., & Falla-Angel, J. (2023). Differential Production of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide among *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, and *Mamestra brassicae* Immune-Activated Hemocytes after Exposure to Imidacloprid and Amitraz. *Insects*, 14(2), 174. <https://doi.org/10.3390/insects14020174>
- Sumner, D., & Boriss, H. (2006). Bee-conomics and the Leap in Pollination Fees. *University of California Giannini Foundation of Agricultural Economics.*, 9(3), 9–11.
- Sweetlove, L. (2011). Number of species on Earth tagged at 8.7 million. *Nature*, news.2011.498. <https://doi.org/10.1038/news.2011.498>
- Switzer, C. M., & Combes, S. A. (2016). The neonicotinoid pesticide, imidacloprid, affects *Bombus impatiens* (bumblebee) sonication behavior when consumed at doses below the LD50. *Ecotoxicology*, 25(6), 1150–1159. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1669-z>
- Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A. K., & Thany, S. H. (2018). Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 151, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature Immunology*, 3(1), 91–97. <https://doi.org/10.1038/ni747>

RÉFÉRENCES

- Tennekes, H. (2010). The Significance of the Druckrey-Küpfmüller Equation for Risk Assessment—The Toxicity of Neonicotinoid Insecticides to Arthropods is Reinforced by Exposure Time. *Toxicology*, 276(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.07.005>
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., & Narat, M. (2017). Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and Varroa mites (*Varroa destructor*). *PLOS ONE*, 12(10), e0187079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187079>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2001). Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Management Science*, 57(10), 914–922. <https://doi.org/10.1002/ps.349>
- Tomizawa, M., Otsuka, H., Miyamoto, T., & Yamamoto, I. (1995). Pharmacological Effects of Imidacloprid and Its Related Compounds on the Nicotinic Acetylcholine Receptor with Its Ion Channel from the *Torpedo* Electric Organ. *Journal of Pesticide Science*, 20(1), 49–56. <https://doi.org/10.1584/jpestics.20.49>
- United Nations, & Jensen, L. (2019). *The United Nations Sustainable Development Goals Report 2019* (p. 64). United Nations. <https://unstats.un.org/sdgs/report/2019/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2019.pdf>
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2002). *US EPA - Pesticides—Fact Sheet for Acetamiprid*. USEPA: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C). https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Frontiers in Immunology*, 11, 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämet, M. (2011). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2), 649–656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>

RÉFÉRENCES

- Van Klink, R., Bowler, D. E., Gongalsky, K. B., Swengel, A. B., Gentile, A., & Chase, J. M. (2020). Meta-analysis reveals declines in terrestrial but increases in freshwater insect abundances. *Science*, 368(6489), 417–420. <https://doi.org/10.1126/science.aax9931>
- Vasselon, T., & Detmers, P. A. (2002). Toll Receptors: A Central Element in Innate Immune Responses. *Infection and Immunity*, 70(3), 1033–1041. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1033-1041.2002>
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Walderdorff, L. (2019). *Étude comparative de la réactivité des cellules du système immunitaire (invertébrés et vertébrés) vis-à-vis des pesticides* [Université de Lorraine]. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/DDOC_T_2019_0268_WALDERDORFF.pdf
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., & Falla-Angel, J. (2018). Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (lipopolysaccharide) of *Escherichia coli*. *Journal of Insect Physiology*, 108, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.002>
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Wechtler, L., Bonnefoy, A., & Falla-Angel, J. (2019). Phagocytic activity of human macrophages and *Drosophila* hemocytes after exposure to the neonicotinoid imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.07.007>
- Weber, A. N. R., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelièvre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J.-L., & Gay, N. J. (2003). Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature Immunology*, 4(8), 794–800. <https://doi.org/10.1038/ni955>
- Wei, F., Wang, D., Li, H., Xia, P., Ran, Y., & You, J. (2020). Toxicogenomics provides insights to toxicity pathways of neonicotinoids to aquatic insect, *Chironomus dilutus*. *Environmental Pollution*, 260, 114011. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114011>

RÉFÉRENCES

- Wu, C.-H., Lin, C.-L., Wang, S.-E., & Lu, C.-W. (2020). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, on the echolocation system of insectivorous bats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.10.010>
- Wu, M.-C., Chang, Y.-W., Lu, K.-H., & Yang, E.-C. (2017). Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 88, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>
- WWF, Almond, R. E. A., Grooten, M., Juffe Bignoli, D., & Peterson, T. (2022). *WWF (2022) Living Planet Report 2022—Building a nature-positive society*. WWF, Gland, Switzerland.
- Xu, J., Strange, J. P., Welker, D. L., & James, R. R. (2013). Detoxification and stress response genes expressed in a western North American bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics*, 14(1), 874. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-874>
- Yadav, S., Gupta, S., & Eleftherianos, I. (2018). Differential Regulation of Immune Signaling and Survival Response in *Drosophila melanogaster* Larvae upon *Steinernema carpocapsae* Nematode Infection. *Insects*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.3390/insects9010017>
- Yutin, N., Wolf, M. Y., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2009). The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biology Direct*, 4(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-9>



ANNEXES



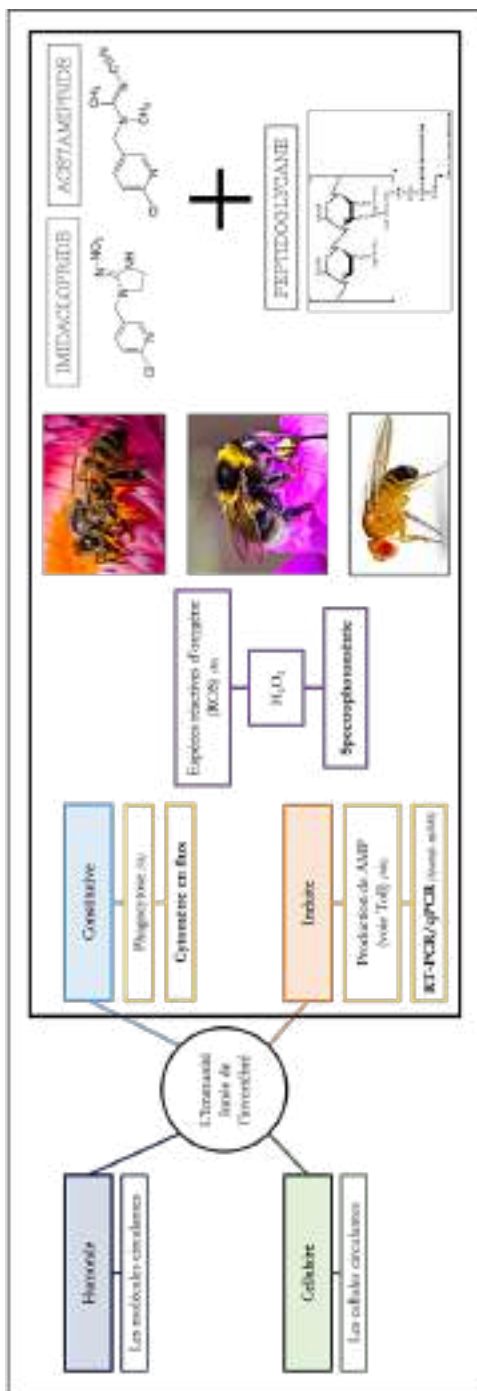
ANNEXE I

Tableau de concentrations de DL₅₀ de différentes espèces

<i>Species</i>	Molécule	LD ₅₀	Voie-Stade	Source
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	18 µg/bee	Orale	Casida 2018
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	0.0038 µg/bee	Orale	EPA Ecotoxicity Database
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	0.013 µg/bee	Orale-larvae	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	0.179 µg/bee	Topicale	Iwasa 2004
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	0.078 µg/bee	Topicale	EPA Ecotoxicity Database
<i>Apis mellifera</i>	Imidaclopride	0.061 µg/bee	Topicale	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	8100 µg/bee	Orale	Casida 2018
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	15.1 µg/bee	Orale	EPA Ecotoxicity Database
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	14 µg/bee	Orale-larvae	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	7.07 µg/bee	Topicale	Iwasa 2004
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	8.1 µg/bee	Topicale	EPA Ecotoxicity Database
<i>Apis mellifera</i>	Acetamipride	7.9 µg/bee	Topicale	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Bombus terrestris</i>	Imidaclopride	0.04 µg/bee	Orale-24h	Marletto et al. 2003
<i>Bombus terrestris</i>	Imidaclopride	0.02 µg/bee	Orale-72h	Marletto et al. 2003
<i>Bombus terrestris</i>	Imidaclopride	5.15 ng/bee	Orale	Switzer & Combes 2016
<i>Bombus terrestris</i>	Imidaclopride	0.027 µg/bee	Orale-larvae	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Bombus terrestris</i>	Imidaclopride	0.02 µg/bee	Topicale	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Bombus terrestris</i>	Acetamipride	>100 µg/bee	Topicale	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Bumblebee</i>	Acetamipride	22.2 µg/bee	Orale-larvae	Sanchez-Bayo & Goka
<i>Drosophila melanogaster CS</i>	Imidaclopride	0.41 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸</i>	Imidaclopride	1.39 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster Oregon</i>	Imidaclopride	0.81 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster CS</i>	Imidaclopride	4.58 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸</i>	Imidaclopride	4.57 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster Oregon</i>	Imidaclopride	4.12 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster CS</i>	Acetamiprid	0.65 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸</i>	Acetamiprid	1.71 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster Oregon</i>	Acetamiprid	1.26 µg/g	larvae	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster CS</i>	Acetamiprid	7.54 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸</i>	Acetamiprid	7.80 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013
<i>Drosophila melanogaster Oregon</i>	Acetamiprid	6.65 µg/g	adulte	Shahid-Arain et al. 2013

ANNEXE II

Description graphique de l'hypothèse scientifique et du résumé entrepris pour l'étude en question



ANNEXE III

Tableau de composition de milieu de congélation et décongélation pour les cellules Schneider-2 de *Drosophila melanogaster*

Composé	Milieu de Congélation	Milieu de Décongélation
Milieu d'insecte Schneider	34.5 %	39.5 %
Milieu d'insecte TC-100	34.5 %	39.5 %
SVF inactivé	20 %	20 %
Pénicilline/Streptomycine (P/U)	1 %	1 %
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	10 %	<i>s.o.</i>

ANNEXE IV

Tableau d'analyses statistiques de viabilité cellulaire de *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*

Experimentation	Organisme	Traitement	Duration d'exposition (heures)	N	Analyse Statistique	Post-Hoc	Intervale de confiance	valor <i>p</i>
Viabilité cellulaire (Trypan Blue)	<i>Drosophila melanogaster</i>	PGN 0	24	3	Kruskal-Wallis	Dunn's	95%	0.048594
		PGN 1						0.085710
		PGN 5						0.017000
	<i>Apis mellifera</i>	PGN 0		3	ANOVA	Duncan	95%	<0.0001
		PGN 1						0.02856
		PGN 5						0.07586
	<i>Bombus terrestris</i>	PGN 0		3	Kruskal-Wallis	Dunn's	95%	0.02418
		PGN 1			ANOVA	Duncan	95%	0.00389
		PGN 5			ANOVA	Duncan	95%	<0.0001

ANNEXE V

Tableau d'analyses statistiques de Phagocytose de *Drosophila melanogaster*,
Apis mellifera et *Bombus terrestris*

Experimentation	Organisme	Traitement	Duration d'exposition (heures)	N	Analyse Statistique	Post-Hoc	Intervale de confidence	valor <i>p</i>
Phagocytose	<i>Drosophila melanogaster</i>	PGN 0	18	3	ANOVA	Duncan	95%	<0.0001
		PGN 1						0.00710
		PGN 5						0.05260
	<i>Apis mellifera</i>	PGN 0		3				0.05333
		PGN 1						0.00600
		PGN 5						0.72796
	<i>Bombus terrestris</i>	PGN 0		3				0.22319
		PGN 1						<0.0001
		PGN 5						0.00016

ANNEXE VI

Tableau d'analyses statistiques de la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*

Experimentation	Organisme	Traitement	Duration d'exposition (heures)	N	Analyse Statistique	Post-Hoc	Intervale de confidence	valor <i>p</i>
Reactive Oxygen Species (ROS) Hydrogen Peroxide/Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	<i>Drosophila melanogaster</i>	PGN 0	3	3	ANOVA	Duncan	95%	0.00911
		PGN 1						0.04061
		PGN 5						0.34756
	<i>Apis mellifera</i>	PGN 0		3				0.01225
		PGN 1						<0.0001
		PGN 5						0.00294
	<i>Bombus terrestris</i>	PGN 0		3				0.10427
		PGN 1						0.05629
		PGN 5						0.00458

ANNEXE VII

Tableau d'analyse statistiques de l'expression génétique de *spaetzle* et *myD88* de l'*Apis mellifera*

Experimentation	Organisme	Traitement	Duration d'exposition (heures)	N	Analyse Statistique	Post-Hoc	Intervale de confidence	valor <i>p</i>
Expression génétique: <i>spaetzle</i>	<i>Apis mellifera</i>	PGN 0	18	3	ANOVA	Tukey (HSD)	95%	<0.0001
		PGN 1						0.00428
		PGN 5						<0.0001
Expression génétique: <i>myD88</i>	<i>Apis mellifera</i>	PGN 0		3				<0.0001
		PGN 1						<0.0001
		PGN 5						<0.0001

Abstract

Over the last three decades, an exponential increase in global agriculture has witnessed the creation of a new class of “plant protection products” called neonicotinoids. Although popular due to their systemic mode of action, they have been widely implicated in numerous toxicological effects on pollinators. It is important, therefore, to understand their cumulative impact at the cellular level in pollinators such as the domestic Honeybee (*Apis mellifera*) and the Bumblebee (*Bombus terrestris*). This *in vitro* study looks at the quality of immune response in insect haemocytes following acute exposure to imidacloprid and/or acetamiprid. Using peptidoglycan as an immune activator, the quality of constitutive and induced immune responses, such as production of anti-microbial peptides and hydrogen peroxide as well as phagocytosis in both organisms is compared to that of the model system of *Drosophila melanogaster*.

Résumé

Au cours des trois dernières décennies, l'augmentation exponentielle de l'agriculture mondiale a entraîné la création d'une nouvelle classe de "produits phytopharmaceutiques" appelés néonicotinoïdes. Bien que populaires en raison de leur mode d'action systémique, ils ont été largement impliqués dans de nombreux effets toxicologiques aux pollinisateurs. Il est donc important de comprendre l'impact cumulatif de ces néonicotinoïdes au niveau cellulaire chez les pollinisateurs tels que l'abeille domestique (*Apis mellifera*) et le bourdon (*Bombus terrestris*). Cette étude *in vitro* examine la qualité de la réponse immunitaire dans les hémocytes d'insectes après une exposition aiguë à l'imidaclopride et/ou à l'acétamipride. En utilisant le peptidoglycane comme activateur immunitaire, la qualité de réponses immunitaires constitutives et induites, telles que la production de peptides antimicrobiens et de peroxyde d'hydrogène, ainsi que la phagocytose dans les deux organismes sont comparées à celles du système modèle de *Drosophila melanogaster*.

