

Université de Mons
Faculté des Sciences
Laboratoire de Zoologie

Impact des phtalates sur le développement de
micro-colonies de *Bombus terrestris* L.

Mémoire de fin d'études présenté par

Charlotte Terzo

En vue de l'obtention du grade de

Maître en biologie des organismes et écologie

Directeur de mémoire : Prof. **Denis Michez**

Superviseure : **Justine Dewaele**

Année académique 2022 – 2023

C. Terzo, 2023. Impact des phtalates sur le développement de micro-colonies de *Bombus terrestris* L. Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, 85 p.

Résumé :

Les villes développent des zones de plus en plus attractives pour les pollinisateurs sauvages, mais ces zones sont aussi des milieux très restreints. L'habitat qu'ils fournissent est fragmenté et les polluants atmosphériques sont très présents. Ces polluants urbains comprennent les phtalates, les hydrocarbures aromatiques et polycycliques, le nonylphénol et autres. Parmi eux, les phtalates sont considérés comme des perturbateurs endocriniens pouvant altérer le métabolisme des insectes. L'olfaction faisant partie intégrante du système endocrinien, la communication entre les insectes et les plantes peut être perturbée. De même, la voie de signalisation des ecdystéroïdes qui permet aux abeilles de contrôler la mue et la métamorphose des larves peut être compromise. Deux phtalates ont été sélectionnés car ils sont les plus utilisés au monde et font partie des phtalates considérés comme ayant le plus d'impact sur le métabolisme et le développement de nombreuses espèces. Il s'agit des phtalates de DEHP et de DnBP qui ont été soumis à concentration environnementale individuellement ainsi que leur cocktail à des microcolonies saines de *Bombus terrestris*, chacune contenant 10 ouvrières. Ces microcolonies ont été élevées durant 35 jours et nourries *ad libitum* en sirop et en pollen. Chaque ouvrière a été exposée topiquement une fois par semaine. L'impact des différents traitements est mesuré à l'échelle coloniale par plusieurs réponses de stress (taux de mortalité, éjection larvaire, dilution de pollen, efficacité pollinique), et à l'échelle individuelle en mesurant le taux de corps gras des ouvrières et des mâles émergés. Nos résultats indiquent que le DEHP semble induire une mortalité et un stress plus important, que le stress engendré par le DnBP. Cependant, le DnBP à forte dose aurait tendance à augmenter le taux de corps gras des abeilles par rapport à la dose inférieure, nécessaire à la réponse immune et à la production d'ecdystéroïdes, suggérant une réponse de stress face au traitement. Il engendrerait aussi une augmentation des masses des pupes et des mâles non-émergés. En conclusion, nous avons démontré que les phtalates sont nocifs pour le bourdon terrestre en dose normale d'exposition mais davantage d'études sont nécessaires à la compréhension des impacts physiologiques des phtalates sur les arthropodes.

Mots-clés : Bourdon, microcolonie, *Bombus terrestris*, toxicité, phtalates, DEHP, DnBP, perturbateur endocrinien

C. Terzo, 2023. Impact des phtalates sur le développement de micro-colonies de *Bombus terrestris* L. Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, 85 p.

Abstract:

Cities are developing areas that are increasingly attractive to wild pollinators, but these areas are also very small. The habitat they provide is fragmented and air pollutants are very present. These urban pollutants include phthalates, aromatic and polycyclic hydrocarbons, nonylphenol and others. Among them, phthalates are considered endocrine disruptors that can alter the metabolism of insects. Since olfaction is an integral part of the endocrine system, communication between insects and plants can be disturbed. Similarly, the ecdysteroid signaling pathway that allows bees to control larval moulting and metamorphosis can be altered. Two phthalates were selected because they are the most widely used in the world and are among the phthalates considered to have the greatest impact on the metabolism and development of many species. These are DEHP and DnBP phthalates that have been individually subjected to environmental concentrations and their cocktail to healthy *Bombus terrestris* microcolonies, each containing 10 workers. These microcolonies were bred for 35 days and fed ad libitum with syrup and pollen. Each worker was exposed topically once a week. The impact of different treatments is measured at the colonial scale by several stress responses (mortality rate, larval ejection, pollen dilution, pollen efficiency), and at the individual scale by measuring the fat content of workers and emerged males. Our results indicate that DEHP appears to induce more mortality and stress than DnBP. . However, high-dose DnBP would tend to increase bee fat levels relative to the lower dose required for immune response and ecdysteroid production, suggesting a stress response to treatment. It would also lead to an increase in pupal and non-emerged male masses. In conclusion, phthalates have been shown to be harmful to bumble bees at normal exposure levels, but more studies are needed to understand the physiological impacts of phthalates on arthropods.

Key words : bumblebee, *Bombus terrestris*, microcolony, toxicity, phthalates, DEHP, DnBP, endocrine disruptor

Remerciements

La concrétisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans le soutien et l'aide de nombreuses personnes que je souhaite remercier. Ce mémoire m'a permis de devenir plus autonome, et également de m'affranchir et être plus confiante en moi dans ce que j'entreprends.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Prof. Denis Michez de m'avoir accueillie au laboratoire de Zoologie afin d'y réaliser mon mémoire. Je remercie également tous les membres de ce laboratoire pour leur bonne humeur et leur disponibilité quand j'avais besoin d'aide, que ce soit pour la dissection des microcolonies ou pour leur expertise en matière d'analyses statistiques avec le logiciel R. Je les remercie aussi pour ces quelques soirées passées ensemble et remplies de convivialité afin de m'intégrer à l'équipe du laboratoire.

Je remercie également mon collègue de travail Sébastien Duterne qui m'a accompagnée en musique dans le nourrissage des microcolonies et avec qui j'ai eu de longues discussions, passé de bons moments et bu de bons cafés préparés par ses soins. Nous avons surmonté bien des galères, et toujours dans la bonne humeur.

Je remercie aussi les autres étudiants du laboratoire de Zoologie dont Mélia, Clément, Adrien, Bastien, Joffrey et tant d'autres qui mettaient la bonne humeur au laboratoire et avec qui je me suis tout de suite sentie bien. Merci pour ces bons moments passés à vos côtés et pour ces sessions de Pokémon Go. Et arrêtez de piquer mon arène !

Je tiens également à remercier ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans ce que je faisais, et d'avoir cru en moi. Merci de m'avoir permis de continuer l'équitation malgré mes études, qui était mon ressourcement principal. Merci à mes parents de m'avoir transmis cet amour pour la nature et la biologie. Merci à ma sœur Clémence d'être venue m'aider à nourrir mes bourdons et pour son soutien émotionnel.

Je souhaite également remercier du fond du cœur Justine Dewaele, sans qui, tout cela n'aurait pas été possible. Elle a été d'une grande aide pour la réalisation de ce mémoire et toujours disponible malgré la distance. Son expertise et sa pédagogie m'ont permis de passer cette année en toute confiance. Merci aussi à Antoine Gekière pour tous ses conseils et son aide précieuse.

Je remercie enfin mon ami Rodrigue pour avoir toujours été présent, pour m'avoir motivée, soutenue, rassurée et aidée tout au long de cette année difficile.

Merci à vous tous.

Table des matières

CHAPITRE 1 : Introduction	1
1.1 Contexte de l'étude : le projet ASPI	1
1.2 Les phtalates	2
1.2.1 Caractéristiques chimiques.....	2
1.2.2 Sources et utilités.....	2
1.2.3 Pollution environnementale aux phtalates.....	4
1.2.4 Impact écologique des phtalates.....	7
1.3 Les abeilles	10
1.3.1 Généralités.....	10
1.3.2 Importance de la pollinisation	12
1.3.3 Déclin	13
1.1.4 Physiologie et exposition aux phtalates.....	15
CHAPITRE 2 : Objectifs du mémoire et hypothèses de départ	18
CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes	19
3.1 Modèle biologique et molécules étudiées	19
3.1.1 <i>Bombus terrestris</i> (L. 1758)	19
3.1.2 Molécules étudiées	21
3.2 Dispositif expérimental	22
3.2.1 Élevage des microcolonies	22
3.2.2 Consommation de pollen et de sirop	25
3.2.3 Exposition topique des individus.....	26
3.3 Paramètres mesurés	27
3.3.1 A l'échelle coloniale.....	27
a. Mortalité.....	27
b. Production du couvain et consommation des ressources	28
3.3.2 A l'échelle individuelle	29
a. Effets des traitements sur le taux de corps gras.....	29
b. Prélèvements pour des analyses ultérieures	30
3.4 Analyses statistiques	30
3.4.1 Mortalité.....	30
3.4.2 Production du couvain et consommation des ressources.....	30
3.4.3 Effets des traitements sur le taux de corps gras.....	31
CHAPITRE 4 : Résultats	32
4.1 Mortalité	32
4.2 Consommation des ressources et développement du couvain	34

4.3	Effets des traitements sur le taux de corps gras	39
CHAPITRE 5 : Discussion des résultats et conclusions générales		42
5.1	Impact des traitements sur la mortalité	42
5.2	Impact sur le développement larvaire	Erreur ! Signet non défini.
5.3	Perspectives	46
5.4	Conclusion	48
CHAPITRE 6 : Références		50
ANNEXES		66
7.1	Expérience préliminaire.....	66
7.3	Compléments de résultats	70

CHAPITRE 1 : Introduction

1.1 Contexte de l'étude : le projet ASPI

Mon mémoire s'intègre dans le projet ASPI (Abeilles sauvages en ville : effets des polluants urbains sur la santé des insectes et sur les interactions plantes – pollinisateurs), un projet scientifique interdisciplinaire sur les polluants urbains et leurs effets sur la santé des insectes et les interactions plantes-pollinisateurs. Il est dirigé par Virginie Cuvillier et regroupe le CEFE de Montpellier (Magali Proffit), le laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons (Denis Michez), le laboratoire LASIRE de Lille (Nicolas Visez) et le laboratoire Evo-Eco-Paleo de Lille (Nina Hautekeete, Virginie Cuvillier et Yves Piquot). Ce projet vise à étudier l'effet des phtalates (polluants urbains) sur les pollinisateurs sauvages. Il compare d'une part sur le terrain les effets sur des sites fort pollués et des sites peu pollués et, d'autre part, expose en laboratoire des individus à des polluants afin de simuler une exposition à concentration semblable aux zones urbanisées en conditions contrôlées.

Deux principaux axes de recherche ont été établis comme suit.

1. Mesures de la dynamique de contamination et effets de l'exposition aux polluants urbains sur *Bombus terrestris* en milieu sauvage : l'intérêt est de déterminer les taux de contaminations atmosphériques et cuticulaires, et si la contamination observée en milieu sauvage a un lien avec la contamination du milieu de vie.
2. Effets des phtalates sur la santé coloniale et individuelle de *Bombus terrestris* : il s'agit de l'analyse des effets coloniaux et individuels en milieu contrôlé en déterminant les effets d'une contamination environnementale sur l'immunité des bourdons et sur leur développement, et en déterminant si la voie hormonale des ecdystéroïdes est affectée, et à quel niveau.

Ce mémoire se concentre sur le deuxième axe et entre dans le cadre de la thèse de doctorat de Justine Dewaele qui s'inscrit dans ce projet interdisciplinaire et se concentre sur l'effet des phtalates urbains sur la santé du bourdon terrestre.

1.2 Les phtalates

1.2.1 Caractéristiques chimiques

Les phtalates sont des plastifiants dérivant de l'acide phtalique. Ils sont composés d'un noyau benzénique et de deux groupements ester (Fig. 1 ; Weschler *et al.*, 2008). Ils sont obtenus par réaction de l'anhydride phtalique avec des alcools du méthanol et de l'éthanol à l'alcool tridécyle (OCDE, 2018). Les différents phtalates se distinguent par leurs chaînes alkyles. Ils ont l'apparence de liquides inodores, transparents et visqueux (Tab.1). Ils sont hydrophobes et lipophiles, ce qui les rend solubles dans les graisses ou d'autres solvants organiques comme les alcools lourds (Net *et al.*, 2015). Ils sont considérés comme semi-volatiles et peuvent s'adsorber aux particules atmosphériques leur permettant de se disperser dans l'air (Weschler *et al.*, 2008).

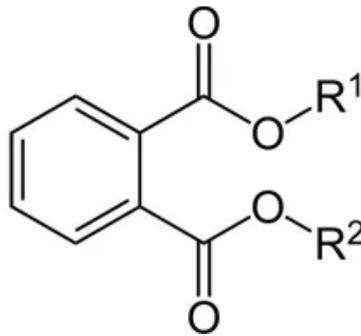


Figure 1 : structure de base des phtalates, où R1 et R2 sont des chaînes alkyles variables (Net *et al.*, 2015).

Tab 1 : tableau des propriétés physicochimiques des phtalates (adapté de Saillenfait, A. M., 2005).

Substances	DBP	BBP	DnOP	DINP	DIDP	DEHP
Aspect	Liquide, incolore, huileux	Liquide, incolore, visqueux	Liquide légèrement jaune, huileux	Liquide, incolore, huileux visqueux	Liquide, huileux visqueux	Liquide incolore, huileux
Poids moléculaire	278,34	312,36	390,56	418,62	446,68	390,56
Point de fusion (°C)	-35	-40	-25	-48	-48	-47
Point d'ébullition	340	370	390	370	370	386
Tension de vapeur	$3,6 \times 10^{-3}$	8×10^{-5} à 25°C	$1,3 \times 10^{-5}$ à 25°C	6×10^{-5} à 20°C	$5,1 \times 10^{-5}$ à 25°C	$1,3 \times 10^{-5}$ à 25°C
Densité	1,04	1,12	0,98	0,97	0,97	0,99
Solubilité dans l'eau	Faible (11,2 mg/L)	Faible (2,7mg/L)	Pratiquement insoluble (0,5µg/L)	Insoluble (<1µg/L)	Insoluble (<1µg/L)	Pratiquement insoluble (3µg/L)

1.2.2 Sources et utilités

D'après la définition donnée par le Conseil de l'Union Internationale de Chimie pure et appliquée (UICPA), un plastifiant est : « une substance ou une matière incorporée dans un matériau (généralement un plastique ou un élastomère) pour en augmenter la flexibilité, la

maniabilité ou la distensibilité ». Cette définition peut s'appliquer à plusieurs sortes de produits, mais elle fait surtout référence aux matériaux plastiques (Godwin *et al.*, 2005). Plus de 87% des différents plastifiants peuvent être retrouvés dans le PVC (polychlorures de vinyle) tandis qu'on retrouve entre 10 et 70% de types de plastifiants dans les autres objets plastiques (CEFIC, 2018 ; Hahladakis *et al.* 2018). Les phtalates sont donc couramment utilisés comme plastifiants des matières plastiques, et également comme solvants, notamment pour les peintures ou les cosmétiques. Il existe plus de 100 composés de phtalates disponibles dans le commerce, avec une large gamme de propriétés différentes (Phthalates Information Centre 2006). Ils sont les plastifiants les plus utilisés dans le monde (Verrier, 1992), soit un peu plus de 50% du marché européen des plastifiants (Fig. 2, Phthalates Information Centre 2006).

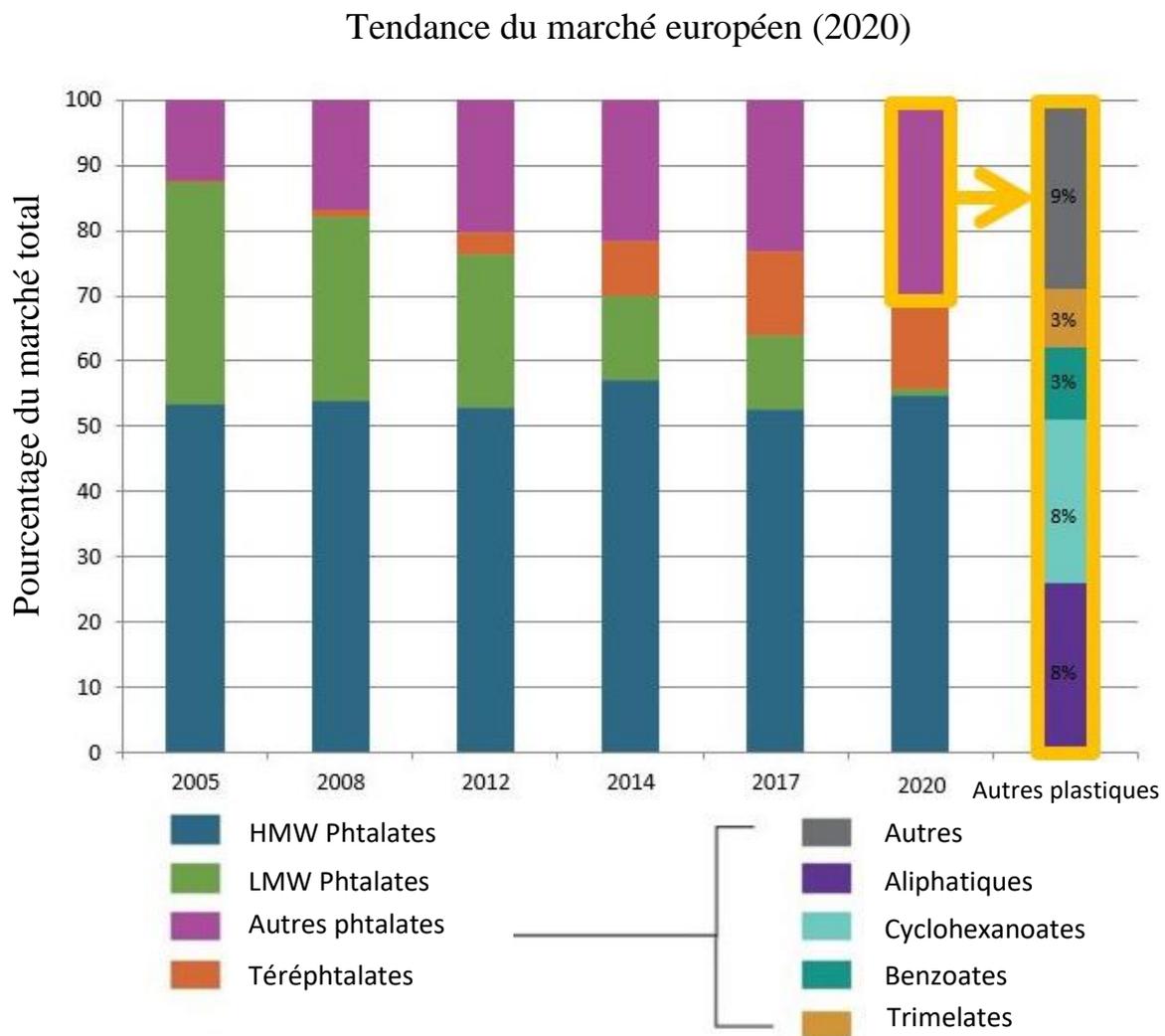


Figure 2 : Estimation d'IHS du marché des plastifiants Européen (Phthalates Information Centre 2006)

Environ 95 % des phtalates produits en Europe sont utilisés pour plastifier le PVC (Phthalates Information Centre 2006). On retrouve également ces plastifiants dans divers objets du quotidien comme les jouets pour enfants, les outils, le matériel médical, les emballages

alimentaires, les pièces automobiles, les revêtements de plancher et meubles, les rideaux de douche et bien d'autres, ou comme solvant dans les insecticides, la peinture, les cosmétiques, les adhésifs et les colles (German S., 2014). La plupart des phtalates sont groupés selon leur poids moléculaire afin de déterminer leur utilisation. Par exemple, le di-2-éthylhexyle (DEHP) ainsi que le phtalate de di-n-octyle (DnOP), de di-isononyle (DiNP) et le phtalate de diisodécyle (DiDP) se retrouvent principalement dans les matériaux de construction comme plastifiants ou dans certains meubles grâce à leur poids moléculaire élevé. Les phtalates à poids moléculaire faible comme le di-n-butyle (DnBP), le di-i-butyle (DiBP), le diméthyle (DMP) et le diéthyle (DEP) sont plutôt utilisés dans les produits cosmétiques ou jouent le rôle de solvant pour les revêtements (SCHETTLER, 2006 ; Chang, 2017).

Grâce au faible coût de production des produits plastiques ainsi qu'à leur grande utilité, la demande au cours du dernier siècle a fortement augmenté (Zhang *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2021). La production des objets plastiques a débuté dans les années 1950 (Haspari M. *et al.*, 2020) et la production actuelle de déchets est estimée à 8 milliards de tonnes par an, et est en augmentation constante (UNEP, 2018). Parmi les plus gros consommateurs d'objets plastiques, on trouve le continent asiatique, avec les 20 pays ayant une gestion des déchets plastiques la moins efficace. La Chine est le plus grand producteur de plastique et a largement contribué à la production mondiale de polyuréthane et de thermoplastique en 2015 (Dauvergne, P., 2018). Elle a aussi la gestion la moins efficace des déchets plastiques dans le monde, produisant à elle seule 27,7% des déchets mondiaux en 2014 (Jambeck *et al.*, 2014).

Suite à cette production accrue de plastiques au cours du dernier siècle, la production de phtalates a atteint 5,5 millions de tonnes en 2018 (OCDE, 2018 ; Fréry *et al.*, 2020), où le plus grand marché des phtalates au monde revient à la Chine qui en consomme environ 45%. L'Europe et les Etats-Unis ne consomment à eux deux que 25% des phtalates produits comme plastifiants (IHS Markit, 2021). L'utilisation des phtalates est estimée à un million de tonnes par an dans les produits industriels et de production en Europe (Jarnstrom *et al.*, 2009). Malgré la restriction actuelle de l'utilisation de certains phtalates (Zhang *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2021), cette consommation accrue de plastiques et de phtalates aggrave de jour en jour la pollution environnementale (Paluselli *et al.*, 2018).

1.2.3 Pollution environnementale aux phtalates

La pollution environnementale aux phtalates est très présente car ils ne sont pas liés de façon covalente à la matrice plastique à laquelle ils sont ajoutés (Paluselli *et al.*, 2018). Les phtalates peuvent alors facilement migrer, s'évaporer ou être lessivés dans le milieu environnant (Moreira

et al., 2015c). Ils peuvent ensuite être transportés sur de longues distances par les eaux ou par l'air en s'adsorbant aux molécules plastiques atmosphériques (Feng *et al.*, 2020). Ils peuvent aussi se lier à d'autres molécules lipophiles dans l'environnement comme, par exemple, la cuticule des insectes (Lenoir *et al.*, 2014). Les phtalates peuvent aussi être dégradés de différentes façons dans les milieux naturels. C'est le cas par exemple par la photolyse ou l'hydrolyse (Fig. 3; Gao & Wen, 2016).

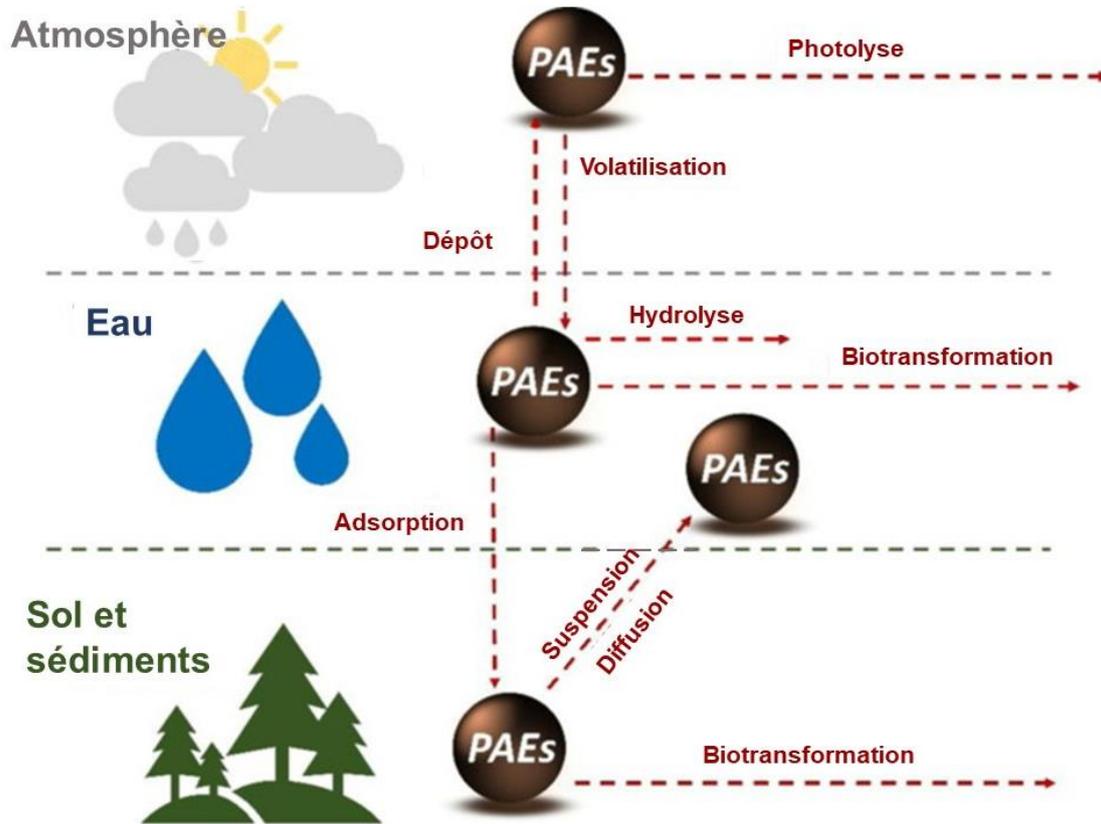


Figure 3 : Occurrence et transfert des esters de phtalate (PAE) entre phases dans l'environnement (traduit de Pang *et al.*, 2021 ; Retravaillé avec la permission de Gao & Wen, 2016).

L'hydrolyse des esters de phtalates est catalysée par des acides, des bases et des ions. Cependant, ce n'est pas la voie de dégradation principale des phtalates puisqu'elle est peu efficace avec les phtalates à longues chaînes (Blanchard *et al.*, 2002). Les phtalates peuvent être dégradés par photolyse sous l'action des UV et l'efficacité de cette dégradation est d'autant plus importante avec l'augmentation de la longueur des chaînes alkyles. Il est également possible de dégrader les phtalates par biotransformation, qui correspond à la dégradation par des organismes pouvant résulter en de l'acide glucuronique (Barron *et al.*, 1995).

Bien que les phtalates sont des molécules instables qui se dégradent vite lorsqu'elles sont libres, ce n'est pas le cas lorsqu'elles sont liées à certains éléments du sol, de l'eau ou de l'air où elles peuvent persister. L'acide fulvique, très présent dans les sols et les eaux et provenant de la

décomposition des plantes, est l'un des principaux éléments naturels auxquels les phtalates se lient. Cette liaison forme un complexe stable soluble dans l'eau. L'acide fulvique agit donc comme transport pour les phtalates et d'autres composés organiques (Ogner & Schnitzer, 1970). Suite à ce transport, des phtalates ont déjà été retrouvés dans des échantillons d'eau, d'air et de sédiments du Golfe du Mexique, ainsi que dans ceux de l'Atlantique Nord dont le DnBP et le DEHP étaient les plus présents (exemple : 1,4-4,1 ng/L de DEHP et 0,4-2,3 ng/L de DnBP dans l'air de l'Atlantique du Nord ; Giam *et al.*, 1978). Dans les grands Lac du Canada, les dépôts de DEHP sont estimés de 1,6 tonnes à 3,7 tonnes par an. Concernant l'eau de pluie, les concentrations de DEHP sont de 0,02 µg/L aux USA (Ligocki *et al.*, 1985) et peuvent aller jusqu'à 39,0 µg/L au Canada (Makepeace *et al.*, 1995). Les taux de DnBP varient entre 0,03 µg/L aux USA (Ligocki *et al.*, 1985) et 11,0 µg/L au Canada (Makepeace *et al.*, 1995). A Paris, en France, les taux de phtalates dans l'eau de pluie sont de 0,42 µg/L pour le DEHP et de 0,59µg/L pour le DnBP (Teil *et al.*, 2006). Les matériaux de construction des bâtiments de zones urbaines seraient responsables de ces taux dans l'eau de pluie (Dargnat, 2009).

Au niveau atmosphérique, il a été recensé 3,4 ng/m³ de DnBP et 28 ng/m³ de DEHP dans l'atmosphère de Paris (Moreau-Guigon *et al.*, 2016). Des taux de phtalates ont aussi été recensés dans des lieux à faible activité anthropique, comme au large de la Mer du nord (1,06 ng/m³ de DnBP et 1,87 ng/m³ de DEHP ; Xie *et al.*, 2006), et sur la cuticule de fourmis en forêt Amazonienne (0.5 ng/mg to 2 ng/mg ; Lenoir, 2016). L'atmosphère serait donc la principale voie de contamination par les phtalates (Eisenreich *et al.*, 1981), en particulier dans les zones urbaines (Salapasidou *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2008).

Concernant la pollution des sols aux phtalates, les taux de DEHP et de DnBP sont les plus importants, avec 0,02 à 264 mg/kg et 0,01 à 30,1 mg/kg respectivement. Il a été démontré qu'ils pénètrent dans les sols par l'irrigation et par l'application de pesticides (Michael *et al.*, 1984) ou par l'épandage de boues d'épuration (Wang *et al.*, 2003). Il a été montré que certains sols en Chine contiennent 3,09 mg/kg et les sols européens en contiennent 0,17 mg/kg (Bergé *et al.*, 2013). Suite à ces chiffres importants de pollution environnementale accrue aux phtalates, les scientifiques ont commencé à étudier l'impact de ces composés sur les écosystèmes.

En raison des impacts des phtalates sur l'environnement et sur la santé humaine après une longue exposition, l'utilisation du DnBP, DEHP, BBP, DINP et du DIDP a été restreinte et réglementée dans l'Union Européenne par la Directive de Commission 2007/19/EC. Concernant les effets constatés sur la fertilité humaine et les perturbations endocriniennes liées aux phtalates, le taux de DnBP dans les jouets ou produits de soin pour enfants n'est plus

autorisé à dépasser 0,1%, tandis que le DEHP a totalement été banni de ces produits (Chronic Hazard Advisory Panel, 1985). Les restrictions précisent une limite de migration spécifique¹ maximale autorisée pour chaque phtalate. Concernant les matériaux en contact avec les aliments, l'utilisation du DEHP est interdite pour les contenants à usage unique (B-Lands Consulting, s. d. UE REACH).

1.2.4 Impact écologique des phtalates

Suite à la pollution importante des phtalates dans l'environnement, les scientifiques ont commencé à étudier l'impact de ces composés sur les écosystèmes. Les phtalates sont connus pour être des perturbateurs endocriniens pour la plupart des vertébrés déjà étudiés (Lyu *et al.*, 2022), pouvant causer des dérèglements hormonaux en interférant avec le bon fonctionnement des glandes endocrines. Cependant, ils présentent des profils de toxicité et d'activités non-monotones, ce qui signifie que l'ampleur des effets ne peut être prédit en fonction de la dose. L'impact de ces molécules est donc imprévisible dans l'environnement (Lagarde *et al.*, 2015; Vandenberg *et al.*, 2012). Les actions principales des perturbateurs endocriniens sont d'agir en compétition sur la liaison d'un récepteur cellulaire, de modifier la conformation de ce récepteur par phosphorylation ou par dimérisation, d'empêcher le transfert intranucléaire ou d'altérer la transcription cellulaire (Sultan *et al.*, 2001). Ces perturbations affectent beaucoup la fertilité des espèces étudiées, provoquant notamment des effets oestrogéniques, anti-oestrogéniques et anti-androgéniques (Jobling *et al.*, 1995 ; Moore, 2000). Chez le rat, les effets oestrogéniques du DEHP diminuent l'activité de l'aromatase des cellules de la thèque interne folliculaire, interrompant le cycle ovarien (Davis *et al.*, 1994). Les effets du DnBP sont d'empêcher l'implantation des ovocytes fécondés et réduire ainsi la fécondité (Ema *et al.*, 1995-b). Des dérèglements à effets anti-ostrogéniques s'accompagnent d'une hypotrophie du tractus génital des fœtus de rats mâles lorsque la mère est traitée avec une concentration de 1 mg/L de BBP (Harris *et al.*, 1997). La même molécule engendre également une diminution du nombre de spermatozoïdes lors de l'éjaculation chez le rat (Kavlock *et al.*, 2002) et chez l'Humain (Jegou, 1996). Le DEHP altérerait la fertilité des souris femelles à haute concentration et augmenterait le poids corporel et le dépôt de graisse viscérale chez les souris exposées à doses environnementales (Schmidt *et al.*, 2012). Le MEHP Mono-(2-ethylhexyl phtalate), un métabolite du DEHP, montre également des effets anti-androgéniques en agissant sur les tubes séminifères et plus précisément sur les cellules des tubes de Sertoli où l'activité de la succinate

¹ La limite de migration spécifique (LMS) est la quantité maximale autorisée d'un composé par un objet aux denrées alimentaires.

déshydrogénase est restreinte, engendrant leur apoptose (Richburg & Boekelheide, 1996). Les effets des phtalates chez les vertébrés aquatiques, dont certains entrent dans l'alimentation humaine, ont également été étudiés. Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), on observe une diminution de l'ovulation et du nombre d'embryons chez les femelles exposées à des doses environnementales de DEHP, lequel entrave la maturation des ovocytes (Carnevali *et al.*, 2010). Chez les mâles, le DEHP induit une réduction de productions de spermatozoïdes mais une augmentation de production de spermatocytes, suggérant que le DEHP inhibe la progression de la méiose (Uren-Webster *et al.*, 2010). C'est aussi le cas chez les femelles du médaka japonais (*Orizias latipes*) où le DEHP entrave le développement des organes reproducteurs femelles, empêchant la maturation des ovocytes en réduisant la production d'œstrogènes (Kim *et al.*, 2002).

Les phtalates peuvent aussi affecter le développement embryonnaire en plus de la fertilité. Des études sur le rat et la souris indiquent que ces molécules causent également des malformations, des retards de croissances et une mortalité embryonnaire, ce qui pourrait également être le cas chez l'être humain (Gray, 2000 ; Ward. J *et al.*, 1998). Des études sur d'autres organismes aquatiques ont été réalisées, notamment sur les amphibiens chez qui il a été démontré que le DEHP induit une diminution d'éclosions des œufs de grenouilles (Larsson & Thurén, 1987). Chez le xénope (*Xenopus laevis*), Lee *et al.* (2005) émettent l'hypothèse que cette diminution d'éclosions serait la conséquence de malformations lors de l'embryogénèse.

Certaines données sur les invertébrés marins sont également disponibles mais sont beaucoup moins nombreuses que celles sur les vertébrés. Les phtalates induisent des effets sur le système immunitaire, certaines voies hormonales et affectent également le développement. C'est le cas de la moule méditerranéenne (*Mytilus edulis*) chez qui l'exposition au DEHP à dose environnementale engendre un stress cellulaire, un stress osmotique et la stimulation de l'expression de gènes liés au métabolisme énergétique (Xu *et al.*, 2021). Chez la grande daphnie (*Daphnia magna*), une augmentation de la teneur en graisses pourrait être due à l'inhibition de l'absorption et du catabolisme des acides gras suite à une exposition chronique du DEHP, DEP et DBP. De plus, le DEHP 1 μM a augmenté la reproduction de 1,5 fois. La transcription des gènes *cat* et *gst* impliqués dans la voie anti-oxydante, ainsi que le gène *dap1* impliqué dans l'apoptose, ont été régulés à la hausse par le DEHP 10 μL . Le DEP et le DBP à 1 et 10 μM ont quant à eux induit une diminution de l'expression des gènes *gst*, *cat* et *dap1* (Seyoum & Pradhan, 2019). Lors d'une exposition chronique au BBP 1,2 mg/L, l'expression du gène de la vitellogénine (précurseur de la vitelline des jaunes d'œufs, maintenant le cycle de l'œstradiol durant l'oogénèse ; Kim *et al.*, 2011) a été inhibé, le développement des nouveau-nés anormaux

est favorisé, et le cycle de développement embryonnaire est raccourci en affectant les transductions des signaux cellulaires (Li *et al.*, 2021). Une étude sur l'embryogénèse du ver polychète *Galeolaria caespitosa* a révélé que le DBP induit un dysfonctionnement des spermatozoïdes suite à un stress oxydatif, ainsi qu'une embryogénèse altérée (Lu *et al.*, 2017). Les phtalates ont aussi des effets sur le taux de survie, c'est le cas chez la larve aquatique de la mouche arlequin (*Chironomus riparius*), où l'exposition au BBP à 100mg/L a réduit leur taux de survie à 40%. De plus, l'exposition au BBP ou au DEHP semble affecter l'expression des gènes *hsp27* et *hsp70* liés au stress cellulaire, ainsi que la voie des ecdystéroïdes via le récepteur nucléaire *Ecr* à l'ecdysone, hormone induisant la mue (Planelló *et al.*, 2011 ; Herrero *et al.*, 2015). Cette voie des ecdystéroïdes est aussi affectée chez le crabe violoniste (*Uca pugilator*) par le DEHP en inhibant l'activité de la chitobiase en agissant comme antagoniste des hormones de mue ou en interférant avec la synthèse des ecdystéroïdes (Zou & Fingerman, 1999).

Beaucoup d'études ont été réalisées sur la faune aquatique puisqu'elle possède un contact proche intime avec l'eau, comprenant beaucoup d'échanges épidermiques. A contrario, très peu de données sont disponibles concernant les effets sur les arthropodes terrestres puisqu'on pourrait penser qu'ils sont protégés de l'air par leur cuticule (Weill *et al.*, 2004 ; Dong, 2007). Cependant, les phtalates étant lipophiles, il a été démontré que cette cuticule est une voie de contamination importante par les phtalates atmosphériques (Cuvillier *et al.*, 2014). D'après une étude réalisée dans les villes de Guyane française (ex. Kourou et Cayenne), la cuticule des fourmis *Solenopsis saevissima*, et celle d'autres espèces, présenterait des taux de phtalates (DEHP, DBP, DiBP et BBP cumulés) d'environ 25 ng/mg contre seulement 2 ng/mg chez les fourmis vivant en forêt (Lenoir, 2016). La contamination externe des fourmis au DEHP induit la diminution de la ponte des œufs des reines de fourmis noires des jardins (*Lasius niger*), et active leur système immunitaire (Cuvillier *et al.*, 2014). Le DEHP et certains phtalates ont un effet répulsif sur ces fourmis et chez les fourmis rouges (*Formica rufa*) (Chen, 2005). Une autre étude basée sur la noctuelle méditerranéenne (*Spodoptera littoralis*) démontre qu'une exposition au DEHP diminue l'expression des gènes impliqués dans la voie des ecdystéroïdes antennaires (récepteurs nucléaires *Ecr*, *USP*, *E75*, *E78*) et du processus d'olfaction (calmoduline), induisant une diminution des comportements de reproduction des mâles (Avilès *et al.*, 2020). Il a également été détecté une élongation du développement de certains stades larvaires et une mortalité plus élevée (Avilès *et al.*, 2019). Cette étude nous indique que les phtalates peuvent également altérer les voies hormonales des pollinisateurs puisqu'eux aussi dépendent de la voie des ecdystéroïdes antennaires pour leur socialité, le mutualisme plante-pollinisateur et leur reproduction dans le cadre de la reconnaissance d'un partenaire sexuel. Il

Il y a un manque d'études flagrant concernant les arthropodes malgré les voies hormonales atteintes. Au vu des données d'exposition des insectes aux phtalates, les invertébrés terrestres semblent donc être plutôt contaminés par l'atmosphère ou leur environnement proche mais de façon passive (Lenoir, 2012).

Malgré les restrictions européennes et la diminution de leur utilisation, les phtalates ne cessent de se distribuer dans l'environnement et persister longtemps une fois lié à un élément, rendant les populations naturelles toujours exposées. Cependant, des effets significatifs démontrés sur la reproduction et sur le développement de la faune environnementale, ainsi que sur la voie des ecdystéroïdes, pourraient avoir un impact majeur sur les populations. En effet, la voie des ecdystéroïdes impliquée dans l'olfaction de nombreux insectes, dont les abeilles, est utile aux relations intraspécifiques sexuelles, sociales ou mutualistes. Dans le contexte du déclin global des pollinisateurs, les phtalates pourraient donc se révéler être un acteur, sinon majeur pour le moins non négligeable, de la perturbation des populations naturelles, selon un modèle prédictif de la toxicité des phtalates sur les abeilles (Arulanandam *et al.*, 2022).

1.3 Les abeilles

1.3.1 Généralités

Il y a environ 130 millions d'années, au début du Crétacé, les abeilles auraient évolué à partir de guêpes carnivores apoïdes (Michez *et al.*, 2019), traditionnellement appelées sphécides, en association avec les Angiospermes. On en recense actuellement plus de 20.000 espèces (Danforth *et al.*, 2019). Elles font aujourd'hui partie de l'infra-ordre des aculéates, lesquels présentent une taille de guêpe caractéristique, divisé en 3 superfamilles que sont les Chrysoidea, les Vespoidea et les Apoidea. Parmi les Apoidea, on retrouve les apoïdes sphéciformes ou vespiformes qui comprennent 3 familles (Ampulicidae, Crabronidae et Sphecidae) et 893 espèces en Europe. Les apoïdes apiformes sont communément appelés « les abeilles » et comprennent, en Europe, 6 familles (Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae, Melittidae) et plus de 2.000 espèces (Michez *et al.*, 2019). Les abeilles les plus connues du grand public de par leur facilité d'élevage sont l'abeille mellifère (*Apis mellifera*) et le bourdon terrestre (*Bombus terrestris*) (Wilson *et al.*, 2017).

Les abeilles présentent différents types de socialité en fonction des espèces. Le type de socialité le plus courant chez nous est celui des espèces solitaires. Les femelles de ces espèces solitaires construisent leur nid seules et n'entrent pas en contact avec d'autres individus de la même espèce sauf avec les mâles en période de reproduction. Parmi ces espèces solitaires se trouvent

des espèces grégaires, qui nidifient seules mais à proximité du nid d'autres femelles, formant ainsi des bourgades, et interagissant seulement en cas de défense de la zone de nidification (Michez *et al.*, 2019). Un troisième type de socialité est celui des espèces para-sociales dont les femelles collaborent entre-elles pour fabriquer un nid commun. Le quatrième type de socialité est celui des espèces sub-sociales chez qui les femelles s'occupent de leur progéniture en cours de développement et entretiennent des relations sociales avec elles, sans pour autant être organisées en castes. Enfin le dernier type de socialité est celui des espèces eusociales. C'est le cas de *Bombus terrestris* (Michez *et al.*, 2019). Ces espèces vivent en colonie dont le travail est divisé et organisé en castes (Fig. 4) (Lindauer, 1976). Chez les espèces eusociales, la reine assure la ponte des œufs et stérilise ses filles (ouvrières) en libérant une phéromone (Brady *et al.*, 2006). Dans ce type de socialité, soit la colonie présente une phase solitaire dans son cycle de vie, c'est le cas du bourdon terrestre (*Bombus terrestris*) chez qui la jeune reine hiberne seule, soit elle n'en présente jamais, c'est le cas de l'abeille mellifère (*Apis mellifera*) chez qui la reine essaime avec une partie de la colonie (Michez *et al.*, 2019).

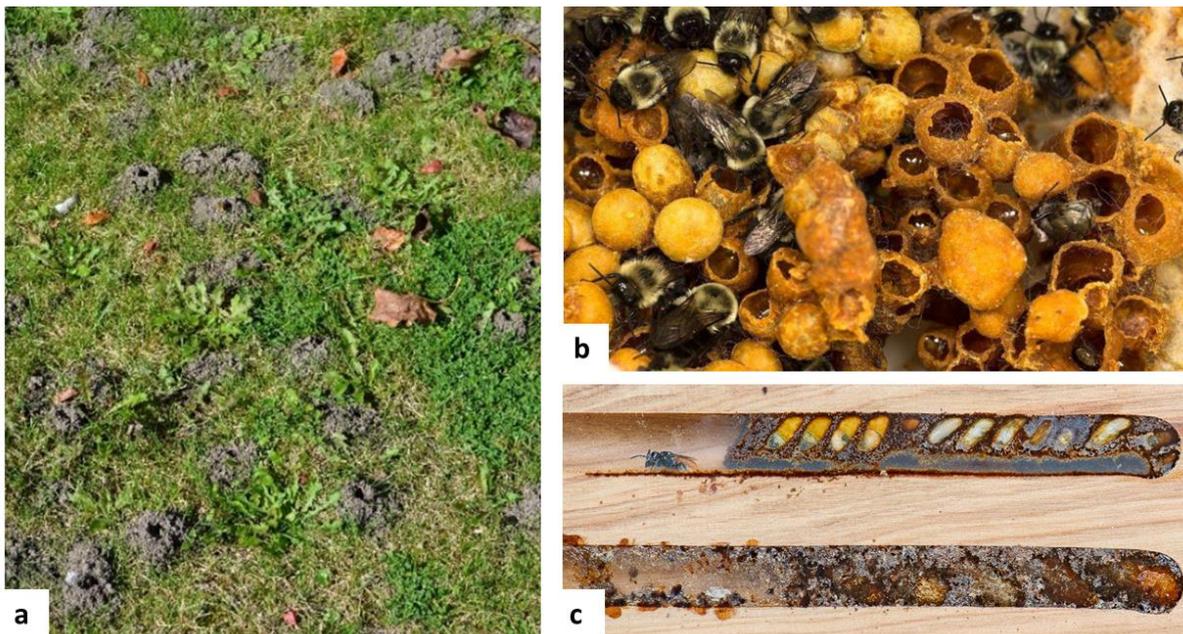


Figure 4 : a. Agrégats de nids d'abeilles solitaires grégaires *Colletes hederæ* (© Peter Thompson). b. Nid d'abeille eusociale *Bombus impatiens*. (© Rob Cruickshank). c. Nid d'abeille solitaire (© nativebeehives.com).

Il existe différentes stratégies de nidification chez les espèces d'abeilles. La première stratégie établie pas les abeilles terricoles fouisseuses est de nidifier dans le sol, en y creusant des galeries (Fig. 4. A.). La deuxième stratégie est adoptée par les abeilles non-fouisseuses qui nidifient hors du sol ou dans des cavités existantes (Fig. 4. B. et C). Ces dernières peuvent nicher dans des végétaux, dans les anfractuosités de la roche ou dans d'anciens nids. Par exemple, la plupart

des abeilles du genre *Xylocopa* nidifient dans le bois mort, *Bombus terrestris* nidifie dans d'anciens nids de rongeurs et *Osmia bicolor* nidifie dans des coquilles d'escargots vides (Michener, 2007). Une troisième stratégie est celle des espèces maçonnes qui construisent leur nid en boue séchée (exemple : *Megachile parietina*) ou en résine (exemple : *Anthidiellum strigatum*).

A l'heure actuelle, les champs ruraux sont pulvérisés par des pesticides et de plus en plus homogénéisés, ce qui ne laisse aux abeilles que le milieu urbain comme refuge (Chapman, Wang & Bourke, 2003 ; Baldock *et al.*, 2015). Leur présence serait favorisée par l'abondance de fleurs diversifiées dans les parcs et jardins, ainsi que par l'interdiction d'utiliser des pesticides en ville (Baldock *et al.*, 2020). On trouve en effet une plus grande densité de nids de bourdons dans les jardins urbains qu'en prairie (Osborne *et al.*, 2008). Cependant, l'imperméabilisation des sols en milieu urbain peut influencer négativement la nidification des abeilles (Geslin *et al.*, 2016), ce qui limite la diversité des espèces présentes en ville (Ahrné *et al.*, 2009).

1.3.2 Importance de la pollinisation

Les abeilles dépendent presque exclusivement du pollen et du nectar des fleurs pour leur alimentation. Le pollen leur apporte lipides et protéides, tandis que le nectar leur apporte les glucides (Vanderplanck *et al.*, 2014). Les abeilles présentent une morphologie efficace adaptée à la récolte du pollen (Michez *et al.*, 2011). Les femelles présentent une brosse de récolte sur différentes parties du corps selon les familles ou l'ingurgite pour le régurgiter ensuite dans leur nid. Cette récolte de pollen permet la pollinisation des Angiospermes par transfert de pollen. Si la pollinisation de certaines espèces d'angiospermes (notamment les poacées) est permise grâce à des vecteurs abiotiques (vent, eau), la plus part sont pollinisée par des vecteurs biologiques (principalement les insectes) (Ollerton *et al.*, 2011). Ces principaux vecteurs biologiques de la pollinisation sont les hyménoptères Apiformes, Agaonidae et Masaridae (Michez *et al.*, 2019). Les hyménoptères représentent 80% de la pollinisation des cultures européennes (Williams, 1994) et 70% de la pollinisation des cultures dans le reste du monde (Klein *et al.*, 2007). Au total, ce service écosystémique par la pollinisation des insectes représente 10% de la production agricole mondiale réservée aux ressources alimentaires humaines. Selon le rapport de l'IPBES de 2019, ce service écosystémique de la pollinisation représente entre 217 et 533 milliards d'euros par an. Cela représente plus de 35% de notre alimentation quotidienne (Blitzer *et al.*, 2016) par les fruits et légumes (Klein *et al.*, 2007).

1.3.3 Déclin

Les abeilles sont très importantes pour la pollinisation des plantes sauvages et de culture, c'est pourquoi le déclin des abeilles est un problème majeur, tant pour la société humaine que pour les écosystèmes (Matias *et al.*, 2017). Parmi les abeilles actuellement en déclin, on trouve essentiellement les Colletidae et les Melittidae (12,8 et 18,9% respectivement) (Porto *et al.*, 2020). Selon la liste rouge européenne établie par l'IUCN et l'UE 27, presque 10% des espèces d'abeilles sont menacées (Fig. 5). Cependant, plus de 56% des données sur le statut des abeilles en Europe sont insuffisantes. C'est pourquoi ces chiffres ne sont pas représentatifs de l'ensemble du déclin des abeilles, lequel pourraient être fortement sous-estimé (Nieto *et al.*, 2014).

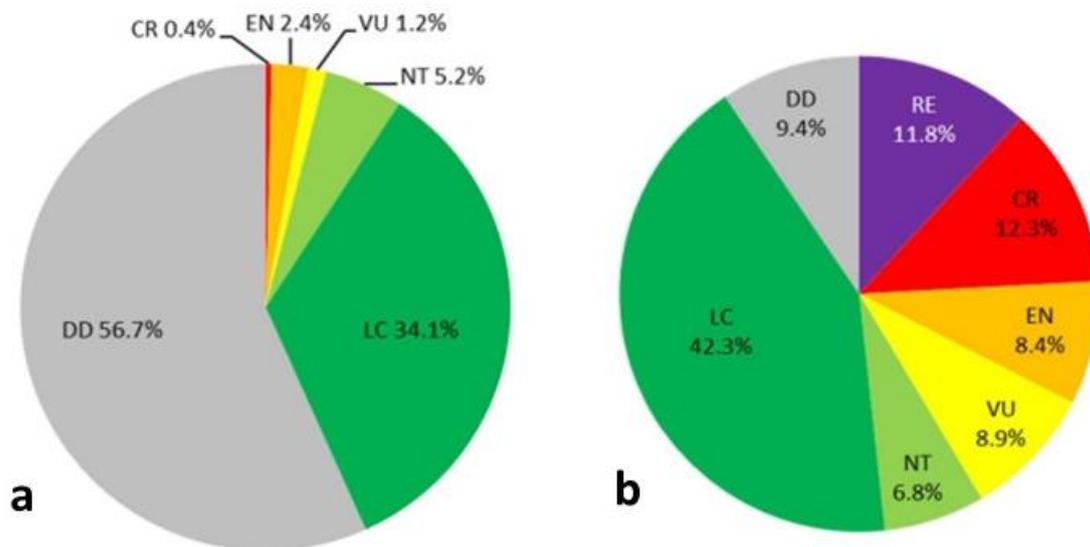


Figure 5 : Statut des abeilles en Europe sur la liste rouge de l'IUCN. a. Liste rouge de l'IUCN des abeilles en Europe. DD = Données insuffisantes, CR = En danger critique d'extinction, EN = En danger, VU = Vulnérable, NT = Quasi-menacé, LC = Préoccupation mineure (Nieto *et al.*, 2014). **b.** Liste rouge de l'IUCN des abeilles en Belgique (Drossart *et al.*, 2019).

En Belgique, 12,3 % des abeilles sont en danger critique d'extinction (47 espèces), 8,4 % sont en danger (32 espèces) et 8,9 % sont vulnérables (34 espèces). Les menaces identifiées pour les abeilles sont (i) les exploitations des mines et carrières, (ii) les perturbations humaines, (iii) les modifications écosystémiques, (iv) le changement climatique, (v) les incendies, (vi) l'urbanisation, (vii) la pollution agricole et sylvicole (viii) l'élevage de bétail et (ix) l'expansion et l'intensification de l'agriculture (Fig. 6, Nieto *et al.*, 2014).

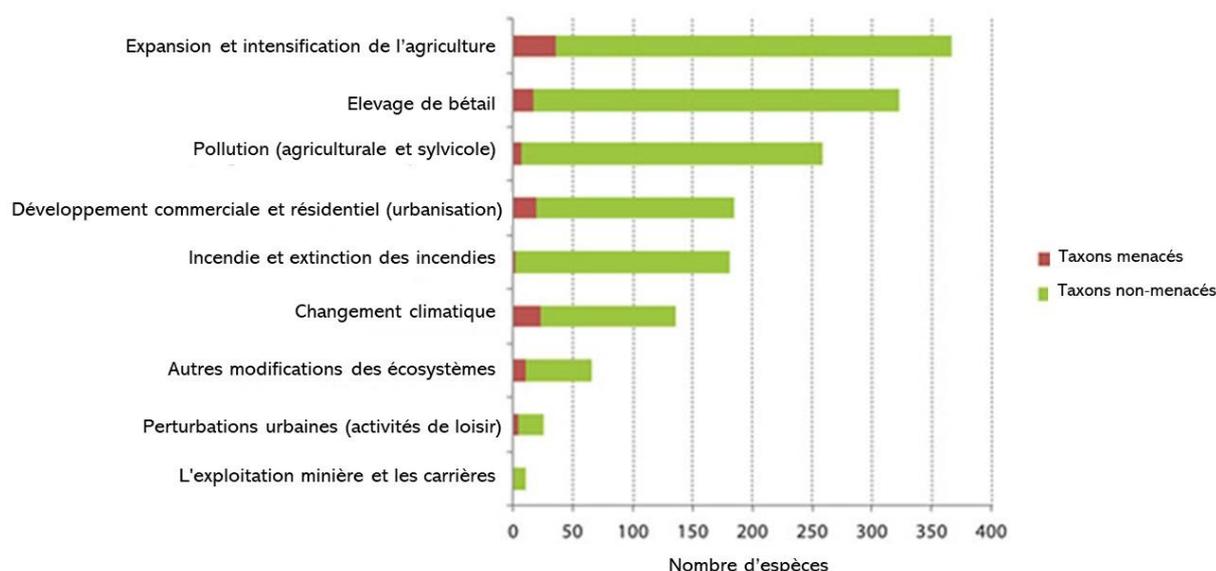


Figure 6 : Principaux facteurs menaçant les abeilles en Europe (traduit de Nieto *et al.*, 2014).

Les causes de déclin sont principalement d'origine anthropique (Goulson *et al.*, 2015 ; Potts *et al.*, 2010). Le changement climatique semble influencer la répartition des bourdons et leurs aires de distribution dans le monde entier (Kerr *et al.*, 2015). Ce changement est généré par la société humaine favorisant l'urbanisation (Kennedy *et al.*, 2019), engendrant la fragmentation des habitats (Goulson, 2003), ainsi que par l'expansion agricole comprenant l'utilisation des engrais et pesticides.

En effet, l'altération des habitats a des effets négatifs sur les populations de pollinisateurs, principalement par la perturbation des interactions entre les plantes et les pollinisateurs (Henning & Ghazoul, 2011 ; Geslin *et al.*, 2013). Ces perturbations pourraient être causées par la taille croissante des ouvrières d'abeille (Theodorou *et al.*, 2021). Bien que les jardins familiaux et autres espaces verts urbains peuvent servir d'alternatives importantes aux habitats naturels pour de nombreuses espèces (Baldock *et al.*, 2015), le paysage urbain diminue la diversité d'espèces présentes en ville (Ahrné *et al.*, 2009). D'abord par la perte d'habitats naturels mais aussi par d'autres contraintes (Jones & Leather, 2012) comme l'imperméabilisation des sols empêchant les abeilles de nidifier (Geslin *et al.*, 2016) ou comme l'augmentation du taux de parasitisme chez les bourdons (Theodorou *et al.*, 2016). En plus de ces contraintes, peuvent s'ajouter les effets néfastes de la pollution urbaine, notamment les gaz d'échappement (Leonard *et al.*, 2019; Reitmayer *et al.*, 2019). Les phtalates pourraient s'avérer jouer un rôle dans ce déclin (Rahman & Brazel, 2004) puisqu'ils sont fortement présents dans les sols agricoles et dans les matériaux de construction en ville (Chai *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2019). Or, au vu de l'augmentation croissante de l'urbanisation à l'heure actuelle, les phtalates

pourraient avoir des impacts sur la diversité des abeilles, en plus des effets déjà connus de l'urbanisation sur les populations d'abeilles sauvages en ville.

1.1.4 Physiologie et exposition aux phtalates

Le corps des abeilles se compose d'un exosquelette appelé cuticule, composé de chitine, un polymère de glucose (Andersen, 1979). La cuticule des insectes forme une barrière solide et efficace contre la dessiccation. Elle est composée d'une première couche sous-jacente appelée procuticule (constituée d'un complexe de chitine-protéine permettant sa rigidité), et d'une seconde couche lipidique superficielle appelée épicuticule. L'épicuticule contient des hydrocarbures, des cétones, des alcools, des esters de cire, des aldéhydes ou encore des acides gras libres (HADLEY, 1981).

Dans la physiologie interne des abeilles, on trouve le corps gras qui est essentiel dans le stockage et l'utilisation d'énergie. Il joue un rôle important dans le métabolisme des lipides (Law & Wells, 1989). Il est aussi responsable de la synthèse de la plupart des protéines de l'hémolymphe et d'autres métabolites comme des acides aminés, des lipophorines et les vitellogénines nécessaires à la maturation des œufs (Kilby, 1963). Puisque toutes ces fonctions sont remplies par le corps gras, il est régulé par plusieurs hormones (Gäde, 2004 ; Schooley *et al.*, 2012). De plus, le corps gras stocke des nutriments, dont des acides gras essentiels à la production de phéromones (Lockey, 1988 ; Stanley, 2006), et le glycogène nécessaire à la production d'alcool de sucres permettant la résistance au froid (Storey, 1997).

De plus, les abeilles ont développé des mécanismes de défense immunitaire complexes, auxquels le corps gras participe activement. Une première réponse immunitaire se fait par des mécanismes cellulaires comme la phagocytose ou l'encapsulation, tandis que la deuxième réponse immunitaire est humorale. Le corps gras et les hémocytes participent à la synthèse de protéines et de peptides antimicrobiens, sécrétés dans l'hémolymphe en cas de réponse immunitaire (Gillespie *et al.*, 1997 ; Fowler *et al.*, 2020). Le corps gras est également producteur d'immunoprotéines, et sa masse permet d'évaluer la réponse immunitaire des insectes (Rosales, 2017).

Le système circulatoire des abeilles est un système ouvert composé d'hémolymphe, correspondant au sang de l'insecte et faisant également office de liquide lymphatique. Elle est composée d'eau à presque 90%, de sucre, de sels minéraux, d'enzymes, de protéines, d'acides aminés et de déchets dont l'acide urique à éliminer (Lehneer & Duvoisin, 2003). Elle permet aussi la défense contre les pathogènes via les cellules immunitaires qu'elle transporte (Winston,

1987). L'hémolymph circule grâce à au vaisseau dorsal parcourant l'abdomen dorsalement et composé d'ostioles et de ventricules contractiles (Lehneer & Duvoisin, 2003).

Les abeilles contiennent un système hormonal complexe, important dans la régulation du développement, de la reproduction et du comportement social et de pollinisation. En premier lieu, l'hormone juvénile (JH) est sécrétée par les glandes corporéales (ou *corpora allata*) et régule de nombreux aspects de la physiologie et du développement des insectes. Par exemple, c'est le cas notamment du comportement, de la reproduction et de la croissance (Goodman & Cusson, 1976 ; Riddiford, 1994 ; Wyatt & Davey, 1996). Une autre fonction importante de cette hormone est d'inhiber la voie des ecdystéroïdes. Cette seconde voie contient les principales hormones stéroïdiennes des insectes, produites par les glandes prothoraciques. Elles sont plus connues pour leur rôle dans l'organisation des processus de développement tels que la mue via l'hormone de mue MH, la métamorphose, l'embryogenèse (Gruntenko & Rauschenbach, 2008) et la régulation de la reproduction (Hagedorn, 1985b). Chez les insectes, les perturbateurs endocriniens peuvent agir de différentes manières sur leur système endocrinien. La première voie d'action s'appelle le mimétisme hormonal. La molécule imite l'activité des hormones naturelles des insectes, entraînant une perturbation du développement, de la reproduction ou du comportement (Frye *et al.*, 2012). La seconde voie d'action est le blocage des récepteurs hormonaux, empêchant les hormones naturelles d'agir. La troisième voie d'action des perturbateurs endocriniens est la perturbation de production des hormones en affectant les glandes endocrines.

Les abeilles peuvent facilement entrer en contact avec les phtalates puisque la constitution de leur cuticule est très favorable à leur adsorption suite à leurs propriétés lipophiles (Weschler *et al.*, 2008). Cela indiquerait que la principale voie de contamination se fait par l'atmosphère, bien qu'elle puisse aussi se faire par l'alimentation mais moins efficacement puisque le DEHP est répulsif (Lenoir *et al.*, 2012b ; Cuvillier *et al.*, 2014). L'impact des phtalates sur les différents systèmes physiologiques des abeilles sont très peu connus. Cependant, il se pourrait que leur système immunitaire s'active dans le corps gras (Cuvillier *et al.*, 2014), en plus d'induire un stress cellulaire (Planellò *et al.*, 2011). De plus, l'effet des phtalates sur le système circulatoire des abeilles pourrait induire une modification du nombre d'hémocytes (Kuzukiran *et al.*, 2022). Cette réponse hémocytaire serait une réponse défensive de l'abeille face aux phtalates, puisque l'hématologie permettrait d'évaluer l'état de santé de certains animaux suite à un stress (Fazio, 2019). Ensuite, concernant les effets potentiels des phtalates comme perturbateurs endocriniens des insectes, la voie des ecdystéroïdes et celle de l'olfaction

pourraient être impactées (Avilès *et al.*, 2019, 2020), et altérer ainsi leur comportement de reproduction (Krieger *et al.*, 2006).

Compte tenu des preuves croissantes reliant les phtalates aux effets nocifs sur des voies importantes chez l'insecte durant une période de déclin des populations mondiales d'abeilles, il semble important de comprendre les impacts de ces polluants urbains sur leur santé et leur reproduction.

CHAPITRE 2 : Objectifs du mémoire et hypothèses de départ

Les phtalates sont des polluants catégorisés comme perturbateurs endocriniens particulièrement présents en milieu urbain, et très peu étudiés sur les insectes. Les abeilles étant relativement abondantes en ville et fournissant un service écosystémique important, il est nécessaire de mieux connaître les effets des phtalates sur ces insectes.

Ce travail a pour objectif de comparer les effets de deux différents phtalates (DEHP et DnBP) à concentration environnementale individuellement, et en mélange sur la santé individuelle et coloniale de *Bombus terrestris* L.

Selon une expérience préliminaire du projet ASPI concernant l'effet du DnBP et du DEHP à doses environnementales, 0,1x et 10x, on s'attend à avoir de la surmortalité concernant ces deux molécules. De plus, le mélange cocktail de ces deux phtalates pourrait engendrer une surmortalité comparée à l'exposition des molécules seules. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que l'effet colonial puisse faire un effet tampon sur la toxicité de certaines molécules.

Concernant les effets physiologiques, il est possible que les molécules de DEHP et de DnBP aient des effets sur l'immunité des bourdons comme une augmentation du nombre de cellules d'hémolymphe ainsi qu'une modification du taux de corps gras.

En émettant l'hypothèse que le DEHP et le DnBP aient des effets sur l'immunité et la voie des ecdystéroïdes des bourdons, il est probable que cela affecte également la production du couvain et le développement larvaire.

CHAPITRE 3 : Matériel et méthodes

3.1 Modèle biologique et molécules étudiées

3.1.1 *Bombus terrestris* (L. 1758)

Le bourdon terrestre fait partie de l'ordre des Hyménoptères, plus précisément de la famille des Apidae du genre *Bombus* (Michener, 2000). Il est le bourdon le plus commun sur Terre (Kerr *et al.*, 2015). Les premiers élevages de *Bombus terrestris* ont commencé en 1988 à partir d'individus récoltés en milieu naturel. Aujourd'hui, il est grandement domestiqué et les colonies voyagent régulièrement d'un pays à l'autre, menant ce bourdon à beaucoup de sous-espèces différentes (Velthuis *et al.* 2002 ; Ings *et al.* 2005a). Le bourdon *Bombus terrestris* L. est une espèce d'abeille eusociale. Au début du printemps, la reine de bourdon se réveille d'hibernation et se mets en quête de ressources alimentaires, tels que le pollen et le nectar des fleurs printanières (Fig. 7). Il s'agit de la phase solitaire. Pendant ce temps, elle recherche également un endroit où confectionner un nouveau nid, souvent dans un nid de rongeur abandonné. Sa première construction est un pot à nectar formé à base de cire, ainsi qu'un pain de pollen enveloppé d'une poche de cire lui permettant d'y pondre ses premiers œufs fécondés diploïdes. La phase eusociale de la colonie commence avec l'émergence des premières ouvrières femelles. Les ouvrières participent activement à la collecte de ressources. Au fil des pontes, la réserve de spermatozoïdes de la reine s'amenuise et elle commence à pondre des œufs non-fécondés haploïdes, donnant des mâles. De plus, les ouvrières développent leurs ovaires et se disputent la production de mâles et de futures reines avec la reine actuelle. C'est là que commence la phase de compétition. Les mâles émergés sont rapidement exclus de la colonie à la recherche d'une jeune reine de bourdon à féconder. Les jeunes reines fécondées entrent ensuite en diapause hivernale durant 6 à 9 mois avant de recommencer le cycle (Amsalem *et al.*, 2015b ; Rasmont *et al.*, 2021)

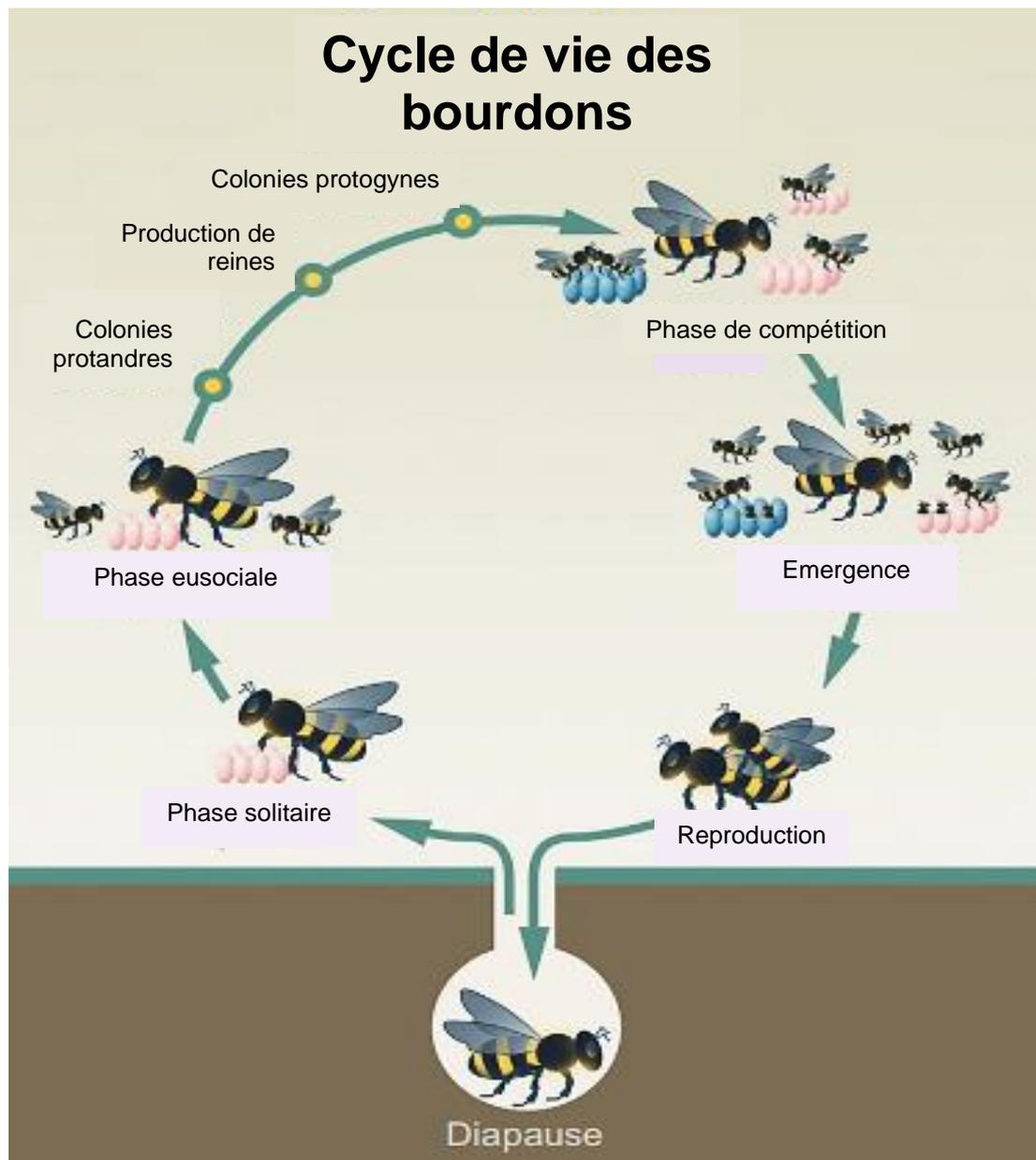


Figure 7 : Cycle de vie des bourdons. (d'après Amsalem *et al.*, 2015). La jeune reine sort de diapause au début du printemps et entre en phase solitaire. Elle cherche des ressources alimentaires, trouve un endroit où nicher et y pond ses premiers œufs diploïdes. Les premières ouvrières émergent, c'est la phase eusociale. Ensuite la phase de compétition a lieu lorsque les ouvrières et jeunes reines émergent et se disputent la production d'œufs mâles haploïdes. Les mâles émergent et quittent la colonie ainsi que les jeunes reines. Les jeunes reines sont fécondées et entre en diapause 6 à mois pendant l'hiver, et le cycle recommence.

Le bourdon terrestre est actuellement exploité commercialement par les agriculteurs afin de favoriser la pollinisation de leurs cultures ou de leurs champs (Sirali *et al.* 2012). *Bombus terrestris* a été sélectionné pour cette expérience puisqu'il s'agit d'une espèce à large distribution dans le monde, mais aussi car elle est domestiquée grâce à sa facilité d'élevage et à sa grande faculté d'adaptation, la rendant facilement procurable en laboratoire (Kleijn & Raemakers 2008). Cette grande disponibilité permet une facilité de production de

microcolonies dans le cadre d'études toxicologiques. De plus, cette espèce permet d'évaluer la qualité de son environnement, étant considérée comme espèce bioindicatrice de la qualité de l'air extérieur, ce qui la rend très utile dans le cadre d'une exposition topique à des polluants urbains (Kevan, 1999).

3.1.2 Molécules étudiées

Les molécules étudiées sont le DEHP (di-2-ethylhexyle phtalate) et le DnBP (di-n-butyl phtalate). Ces molécules ont été choisies puisqu'elles ont des effets sur les voies hormonales des insectes (Planellò *et al.*, 2011 ; Avilès *et al.*, 2019, 2020), en plus d'être très présentes dans l'air des villes.

Durant cette expérience, les individus ont été exposés à différents traitements comprenant une goutte de 2 µl d'eau minérale à 0,07% de méthanol et l'une des 5 concentrations suivantes : (i) DEHP à concentration 12 ng/g d'abeille, (ii) DEHP à concentration environnementale 120 ng/g d'abeille, (iii) DnBP à dose environnementale 60 ng/g d'abeille, (iv) DnBP à concentration 600 ng/g d'abeille et (v) un cocktail de DnBP et de DEHP à doses environnementales. Ces doses ont été établies suite à la découverte de ces concentrations sur la cuticule de 75% des bourdons attrapés dans Lille dans le cadre d'une expérience du projet ASPI, suggérant qu'il s'agisse des concentrations chroniques auxquelles sont exposées les abeilles sauvages à Lille. Dans une précédente expérience d'exposition du projet, il a été décidé d'encadrer ces deux doses environnementales par deux doses où il a été démontré que la dose environnementale du DnBP 60 ng/g générait de la mortalité. Dans ce mémoire, on se concentre sur des concentrations du DEHP et du DnBP générant des effets sur *Bombus terrestris* qui ont été déterminées dans d'autres expériences du projet ASPI (non-publiées à ce jour).

Les solutions mères des molécules actives pour cette expérience proviennent de la firme Sigma-Aldrich™. Il s'agit du DEHP à concentration de $9,85 \times 10^5$ ng/µL (CAS n° 117-81-7) et du DnBP à concentration $1,043 \times 10^6$ ng/µL (CAS n° 84-74-2). L'utilisation de méthanol comme solvant a été nécessaire pour permettre la solubilisation des phtalates dans l'eau mais à un concentration de 0,07% n'a pas été dépassée afin de limiter les effets du solvant sur le bourdon.

3.2 Dispositif expérimental

3.2.1 Élevage des microcolonies

Nous avons réceptionné 5 colonies mères de *Bombus terrestris* L. provenant de la firme Biobest (Biobest Group NV Ilse Velden 18, 2260 Westerloo), maintenues dans une pièce à l'abri de la lumière et à température ambiante. Chaque colonie mère a été étiquetée par une lettre (A, B, C, D, E) afin de pouvoir préparer au mieux les microcolonies. A la fin de la période d'élevage, les colonies mères ont été congelées à -80°C durant minimum 2h afin de les sacrifier.

Les effets des phtalates DEHP et DnBP ainsi que de leur mélange sont testés sur des microcolonies de *Bombus terrestris*. Les 10 microcolonies sont chacune composées de 10 ouvrières aléatoirement sélectionnées au sein des 5 colonies mères fondatrices issues de Biobest (Fig. 8, Biobest Group NV Ilse Velden 18, 2260 Westerloo) Les 5 premières colonies sont installées le premier jour, correspondant au bloc 1, et les 5 suivantes sont installées le deuxième jour, correspondant au bloc 2. Les microcolonies sont placées dans une salle chauffée à $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, avec un taux d'humidité de $61\% \pm 5\%$, qui sont les conditions optimales d'élevage d'après Regali & Rasmont (1995). Il y a 8 traitements dont 3 contrôles (« rien », « eau minérale », « méthanol ») et 5 traitements phtalates (DEHP 12 et 120 ng/g, DnBP 60 et 600 ng/g, et Mix DEHP 120 x DnBP 60 ng/g). Afin de tenir compte des effets potentiels du design expérimental sur le développement des microcolonies, trois conditions de contrôle ont été établis : (i) colonies qu'on ne traite ni aux phtalates ni au froid afin de tenir compte de ces deux facteurs sur la mortalité et le développement de la colonie, (ii) colonies exposées au froid et traitées avec de l'eau minérale afin de tenir en compte les effets du froid sur la mortalité et le développement de la colonie, (iii) colonies exposées au froid et traitées avec une solution de méthanol 0,07% afin de tenir en compte l'impact du solvant.

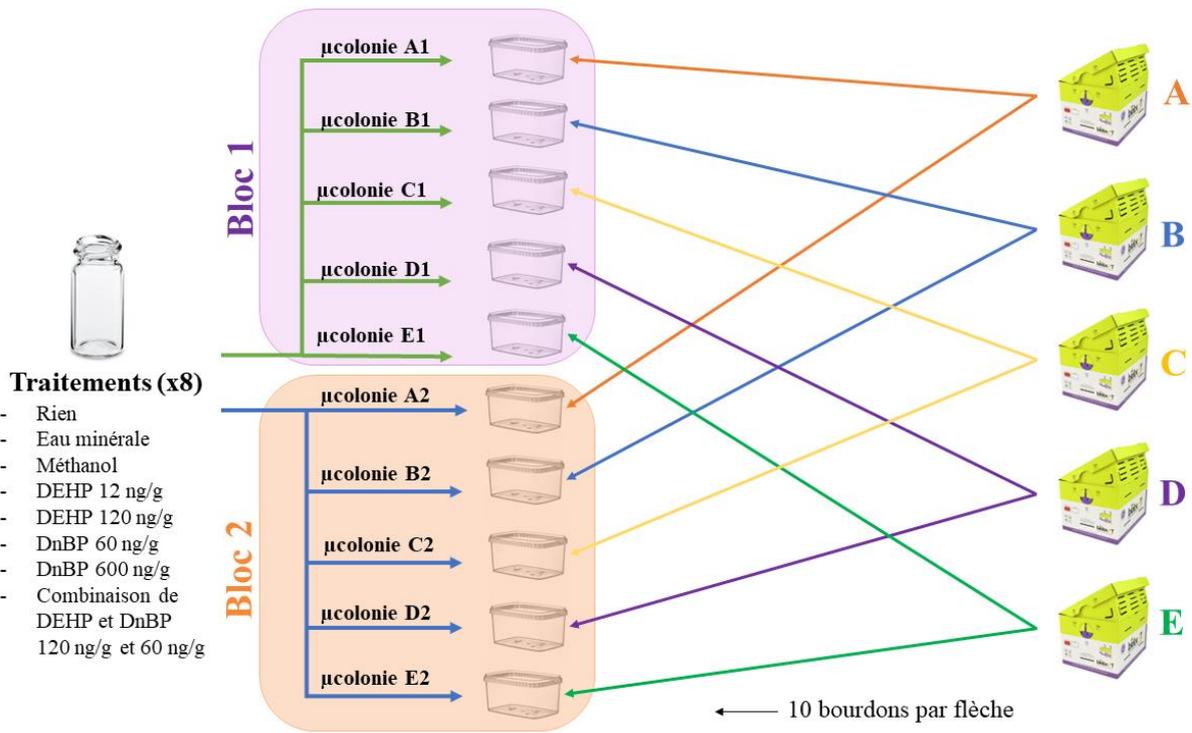


Figure 8 : Schéma explicatif des microcolonies en fonction des traitements et des colonies mères fondatrices. Les flèches représentent un total de 10 bourdons transférés dans une microcolonie à partie d'une colonie mère. Les blocs représentent le décalage des jours d'installation. Le premier jour, le bloc 1 a été installé, le bloc 2 a été installé le lendemain. Les colonies ont été séparées en deux blocs pour faciliter le nourrissage.

Les microcolonies sont constituées de boîtes en plastique transparente de 16 x 16 x 10 cm (Fig. 9). Le sirop qui leur est fourni est stocké dans des pots à sirop de type Corning® Gosselin™ et amené aux ouvrières par capillarité. Du pollen d'aubépine leur est fourni sous forme de candis à l'intérieur de la boîte d'élevage.

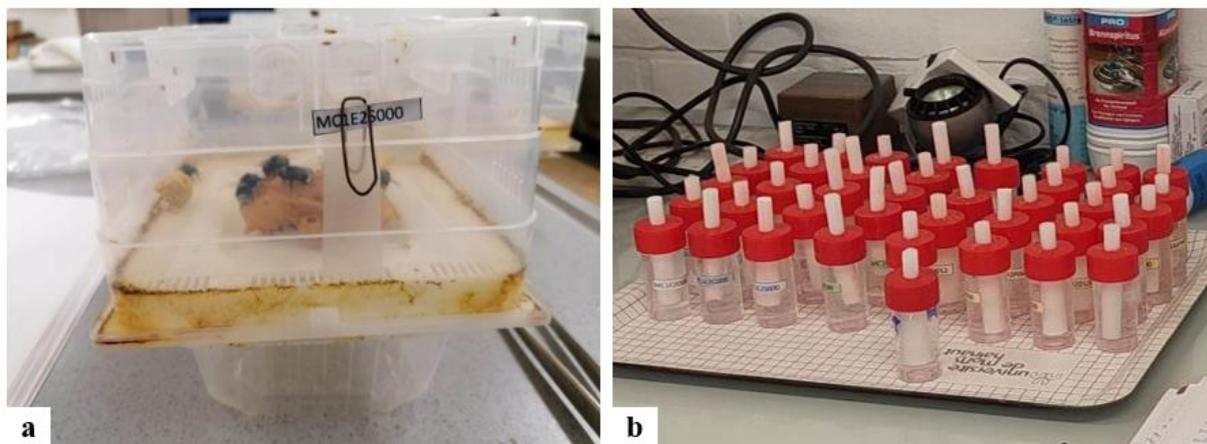


Figure 9 : Installation des microcolonies. a. Microcolonie de *Bombus terrestris* L, il s'agit d'une cage en plastique munie d'un socle grillagé permettant d'évacuer les excréments de la colonie, et d'un couvercle ouvert sur le dessus permettant de faciliter le nourrissage. En dessous se retrouve une boîte en plastique pour y placer le pot à sirop. Photographie : Sébastien Duterne. b. Les pots à sirop sont en

plastique, le couvercle est troué pour permettre le passage d'un capillaire en coton facilitant l'accès au sirop. (Photographies : **a.** S. Duterne, **b.** C. Terzo).

Lors de cette expérience, le plastique a été évité autant que possible et remplacé par du verre sauf pour la structure des microcolonies pour une question de facilité et de coût. De plus, une étude a analysé les eaux versant de l'Escaut, estime un taux allant de $17,2 \pm 2,58$ et $179,1 \pm 26,9$ $\mu\text{g/L}$ concernant les phtalates de DMP, de DEP, de DnBP, de BBP, de DnOP et de DEHP (Net *et al.*, 2015). C'est pourquoi toutes les préparations au contact des bourdons ont été préparées dans de la verrerie décontaminée au préalable à l'hexane et à l'acétone avant chaque utilisation.

Toutes les manipulations des microcolonies ont été réalisées sous lumière rouge afin d'éviter de stresser les bourdons ou de les voir s'échapper. Ne détectant pas la longueur d'onde correspondante au rouge, ils sont moins agressifs et ne s'envolent pas lors de l'ouverture des boîtes (Skorupski & Chittka, 2010).

Les microcolonies sont labellisées selon le nom de l'expérience, la colonie mère, le bloc de lancement et le traitement avant d'être placées sur les étagères par ordre de colonie mère et groupées par traitement (Tab. 2). Sur les 80 microcolonies, 40 ont été installées le premier jour (bloc 1) et les 40 suivantes ont été installées le lendemain (bloc 2), à raison de 5 microcolonies par traitement le premier jour et les 5 autres le deuxième jour. Cela permet de mieux répartir le temps de nourrissage (Fig. 10).

Tableau 2 : Tableau des différents traitements et de leurs caractéristiques.

Abréviations	Type de condition	Molécule/Composition	Dose
O000	Contrôle	Rien	/
S000	Contrôle	Eau minérale + méthanol 0,07%	/
C000	Contrôle	Eau minérale	/
D012	Traitement	DEHP	12 ng/g
D120	Traitement	DEHP	120 ng/g
P060	Traitement	DnBP	60 ng/g
P600	Traitement	DnBP	600 ng/g
X180	Traitement	Mix DEHP 120 ng/g et DnBP 60 ng/g	120x60 ng/g



Figure 10 : Salle d'élevage. Les colonies sont placées sur des étagères triées par traitement, la salle d'élevage est maintenue à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, avec un taux d'humidité de $61\% \pm 5\%$. Photographie : S. Duterne.

3.2.2 Consommation de pollen et de sirop

Les candis sont préparés tous les 2 jours et pesés (erreur standard = $\pm 0,001$ g). Les candis sont préparés en mélangeant du pollen d'aubépine traité aux rayons gamma avec un ratio de 0,15 mL de sirop par gramme de pollen. Le poids des candis est de $1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ par microcolonie entre le premier et le 21^e jour, puis nous avons augmenté la masse des candi à $2 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ de pollen entre le 22^e jour et le 27^e jour afin de garder une consommation non limitée, et enfin à $3 \text{ g} \pm 0,3 \text{ g}$ entre le 28^e jour et le 35^e lorsque la plupart des colonies d'abeilles consommaient entièrement leur candi. Un candi contrôle est également préparé pour mesurer le taux d'évaporation et le tout premier candi est laissé dans la colonie pour permettre aux ouvrières de commencer leur construction par-dessus, au centre de la colonie. En plus du pollen, les ouvrières ont accès à du sirop 50% m/m, où un pot contrôle est aussi nécessaire pour mesurer le taux d'évaporation. Tous les deux jours, les candis et les pots à sirop sont pesés et remplacés afin de déterminer la consommation.

La distribution des candis est réalisée à l'aide d'une plaque en verre préalablement décontaminée à l'hexane puis à l'acétone (Fig. 11). Il est nécessaire d'utiliser de l'eau provenant de bouteilles en verres (Spa Reine, eau plate, 1L) pour fabriquer le sirop afin de limiter au maximum les contaminations par différents phtalates provenant des emballages plastiques.

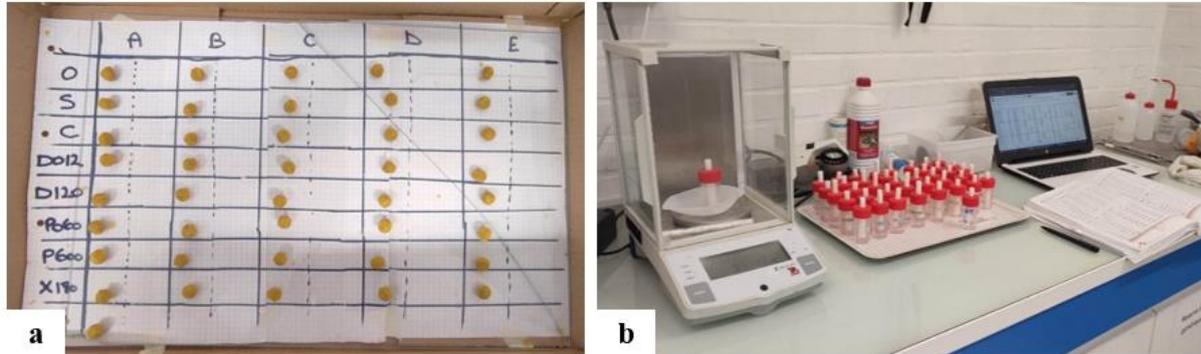


Figure 11 : Nourrissage des colonies. a. Organisation des candis sur une plaque en verre décontaminée. Les candis sont préparé avec du pollen d'aubépine et du sirop (50/50) avec un ratio de 0,15 mL/g de pollen. Les candis sont pesés puis triés par traitement avant le nourrissage. b. Préparation et pesée des pots à sirop sur une balance analytique. Photographies : C. Terzo.

3.2.3 Exposition topique des individus

Il a été décidé d'exposer les bourdons topiquement et non oralement en raison d'une expérience démontrant que les fourmis *Lasius niger* sont capables de détecter les phtalates tels que le DEHP présents dans leur nourriture, et ainsi éviter de s'en sustenter (Cuvillier *et al.*, 2014). Il a donc été émis l'hypothèse que *Bombus terrestris* puisse également être capable de détecter les phtalates dans leur nourriture, ce qui aurait engendré des biais dans notre expérience. L'exposition topique permet d'administrer une dose exacte à concentration exacte et de façon égale à chaque bourdon pour éviter ces biais. De plus, *Bombus terrestris* est un insecte volant exposé en permanence aux phtalates atmosphériques pouvant de ce fait les ramener au sein du nid.

L'exposition des bourdons aux phtalates est réalisée une fois par semaine. Cette fréquence d'exposition est déterminée suite à une expérience préliminaire au cours de laquelle une méthode a été choisie pour minimiser l'impact du froid sur les ouvrières (voir Annexes 7.1). La première exposition a été faite 3 jours après l'installation du bloc expérimental. Les expositions sont réalisées de front par rapport aux traitements, sauf le traitement contrôle « rien » qui est ni exposé au froid, ni aux molécules. Les ouvrières sont endormies deux par deux dans des contenants en verre décontaminés sur glace jusqu'à évanouissement durant dix minutes maximum. Deux microlitres de traitement sont ensuite appliqués sur la partie glabre du thorax de chacune (Fig. 12). Les ouvrières sont ensuite replacées dans leurs microcolonies respectives

en salle d'élevage une fois réveillées à température ambiante afin d'éviter un stress dû à des variations de températures trop importantes.

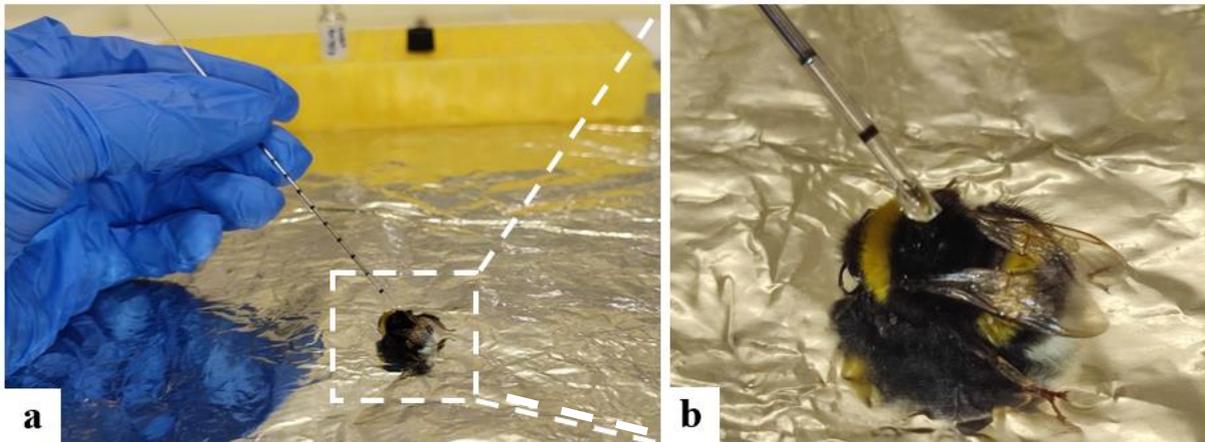


Figure 12 : Exposition aux phtalates d'une ouvrière endormie. a. L'ouvrière a été endormie sur glace durant 10 minutes et est placée sur le ventre. Une goutte de 2 μ L de traitement est appliqué en frottant la pipette sur la partie glabre du thorax. **b.** Agrandissement de la figure a. Photographies : C. Terzo.

3.3 Paramètres mesurés

Les paramètres mesurés ont été recensés à l'échelle coloniale puisque sans reine, l'absence de ses phéromones permettent à une ou plusieurs ouvrières d'entamer la ponte et ainsi le développement de la microcolonie (Röseler, 1970). Les paramètres mesurés à l'échelle coloniale sont ainsi la mortalité des ouvrières, leur consommation en sirop et en pollen, et les différents stades larvaires produits. D'autres paramètres ont été mesurés à l'échelle individuelle dont le taux de corps gras dans le cadre de ce mémoire, et l'expression de gènes impliqués dans l'olfaction et dans la voie des ecdystéroïdes dans le cadre de la thèse de Justine Dewaele. Les paramètres à l'échelle individuelle permet d'analyser les effets des traitements sur la physiologie des abeilles.

3.3.1 A l'échelle coloniale

a. Mortalité

Toutes les ouvrières mortes ont été pesées et recensées selon la date, la colonie et le traitement concerné. De plus, les ouvrières adoptent un comportement qui consiste à éjecter les larves en cours de développement lorsqu'elles sont soumises à un stress (Pomeroy & Plowright, 1979). Cette éjection larvaire permet donc d'évaluer le stress soumis aux colonies selon le traitement employé. De ce fait, il est possible d'évaluer ces réponses de stress en mesurant le nombre de larves rejetées ainsi que la mortalité des ouvrières. Ces mesures sont prises en dénombrant

nombre de larves rejetées par microcolonie d'une part, et en pesant les ouvrières mortes d'autre part.

b. Production du couvain et consommation des ressources

La masse du candi de pollen ainsi que celle du pot à sirop a été relevée tous les deux jours afin de déterminer la quantité consommée par les ouvrières et de suivre la consommation au long des 35 jours d'élevage en fonction des différents traitements. La perte de masse du pollen et du sirop par l'évaporation a été pris en compte à l'aide d'une microcolonie sans ouvrières où les ressources ont été prélevées tous les deux jours également. Afin d'étudier la dynamique de collecte des ressources, la dilution pollinique a été calculée (consommation de sirop cumulée / consommation de pollen cumulée), ainsi que l'efficacité pollinique (masse total des larves (g) / consommation totale de pollen (g)).

En fin d'expérience les couvains sont disséqués afin d'analyser les différents stades de développement des microcolonies (Fig. 13). Ces stades comprennent dans cet ordre : les œufs, les larves non-isolées, les larves isolées pré-défécation, les larves isolées post-défécation, les pupes, les mâles non émergés et les mâles émergés. Ils sont dénombrés et pesés individuellement par stade sur une balance analytique. Uniquement les larves non-isolées sont pesées en groupe et non individuellement, et les œufs et les larves éjectées ne sont pas pesés mais uniquement dénombrés. Un relevé de l'émergence des mâles est effectué lors de la dernière semaine d'élevage. Ce relevé comprend le nombre de mâles par traitement, leur date d'émergence ainsi que leur masse individuelle.

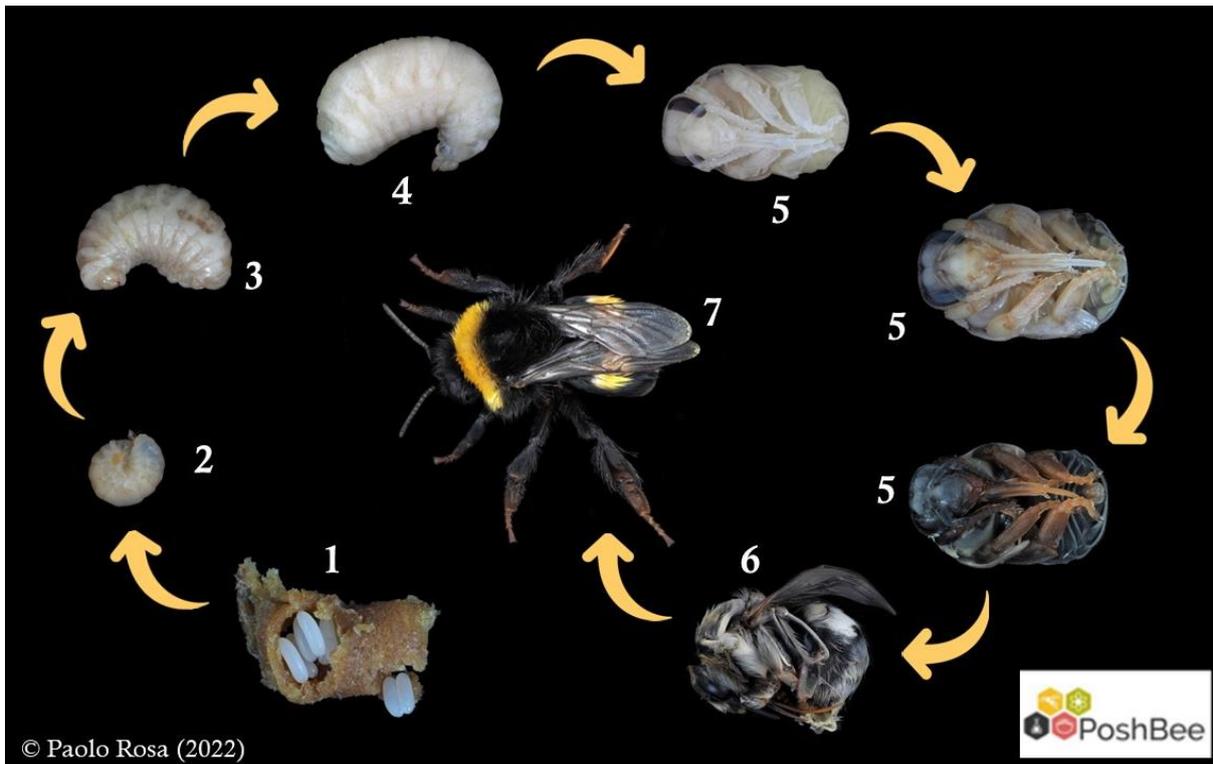


Figure 13 : Photo des stades de développement de *Bombus terrestris* L., 1. Les œufs, 2. Les larves non-isolées, 3. Les larves isolées pré-défécation, 4. Les larves isolées post-défécation, 5. Les pupes, 6. Les mâles non-émergés et 7. Le bourdon terrestre adulte. Crédits des photographies : Paolo Rosa, dans le projet PoshBee (2022).

3.3.2 A l'échelle individuelle

a. Effets des traitements sur le taux de corps gras

A la fin de l'expérience, le taux de corps gras des ouvrières et des mâles a été mesuré. Etant un organe permettant la lipogenèse et la réponse immunitaire, une modification du taux de l'organe pourrait indiquer une défense immune de la part de l'organisme (Rosales, 2017). Le ratio corps gras de 2 ouvrières par traitement a été mesuré quand ce nombre était disponible malgré la mortalité dans la colonie. L'extraction des corps gras a été réalisée selon la méthode d'Ellers (1996), adapté par Gekiere (2021). Les abdomens ont été isolés, pesés puis séchés à 70°C durant 3 jours. Ensuite ils ont été placés dans 2mL de di-éthyl-éther durant 24h. Cela permet de dissoudre les tissus graisseux. Pour extraire la graisse dissoute, il faut rincer deux fois les abdomens au di-éthyl-éther avant de les peser à nouveau après avoir séché 7 jours à 70°C. Le corps gras est mesuré en soustrayant la perte de masse abdominale à la masse totale de l'abdomen sec, divisé pas la masse de l'abdomen frais.

b. Prélèvements pour des analyses ultérieures

Dans le cadre de la thèse de doctorat de Justine Dewaele, les autres individus restants ont été récoltés et disséqués pour des analyses ultérieures, lorsque cela était possible malgré la mortalité dans la microcolonie. Après évanouissement au froid durant 10 minutes maximum sur glace, l'abdomen et les antennes de deux ouvrières par microcolonie ont été prélevés au froid sur une plaque de verre lavée préalablement au RNase Zap®, sous binoculaire. L'hémolymphe de deux ouvrières a été collecté pour une future analyse bactériologique. Ces tissus serviront à quantifier l'expression de gènes de la voie des ecdystéroïdes et ainsi que certains gènes du système immunitaire via RT-qPCR.

Concernant les mâles, en plus d'analyser leur ratio corps gras, le thorax a été prélevé et conservé dans de l'alcool 70% afin de réaliser ultérieurement une étude morphométrique sur leurs ailes. Cependant, ce mémoire se concentre uniquement sur le développement de la colonie avec les pesées de larves, la consommation de pollen et de sirop, la mortalité et l'analyse du ratio corps gras.

3.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R v.4.0.5 (R Core Team 2020). et toutes les figures ont été générées avec ggplot2. Pour les analyses statistiques, la valeur de $p < 0,05$ a été utilisée comme seuil de significativité.

3.4.1 Mortalité

Afin d'étudier l'effet des différents traitements sur la mortalité des ouvrières au sein des microcolonies, une courbe de Kaplan-Meier a été réalisée (fonction « ggsurvplot » du package « survival »), ainsi qu'une analyse de régression cox permettant d'analyser la significativité du taux de mortalité (fonction « coxph » du package « survival »). Cette analyse de régression a été utilisée avec le traitement comme facteur fixe.

3.4.2 Production du couvain et consommation des ressources

Avant de réaliser les analyses statistiques, les données ont été visualisées sur des boîtes de dispersion, et les données de collecte de sirop et de pollen ont été standardisées par la masse du couvain correspondant au jour de collecte des ressources.

Des modèles linéaires mixtes LMM (fonction « glmer » du package « lme4 ») ou des modèles linéaires généralisés à effets mixte GLMM (fonction « glmmTMB » du package « glmmTMB ») ont été calculés afin de comparer les effets des différents traitements de phtalates sur le

développement des microcolonies. Le traitement et le sexe ont été sélectionnés comme facteur fixes, et la colonie mère ainsi que le bloc ont été sélectionnés comme facteurs aléatoires. Lorsque les résultats sont significatifs, un test « pairwise » (fonction « emmeans » du package « emmeans ») est réalisé.

Concernant les valeurs quantitatives discrètes (i.e. dénombrement des différents stades larvaires), une distribution de poisson est utilisée. Mais si la distribution des résidus présentent une sur-dispersion (« testDispersion » du package « DHARMA ») ou des excès de valeurs nulles (fonction « TestZeroInflation » du package « DHARMA »), une distribution binomiale négative est utilisée.

Concernant les valeurs quantitatives continues (i.e. masse des différents stades de développement, collecte de sirop et pollen), un modèle linéaire mixte à distribution gaussienne LMM (fonction « lme4 » du package « lme4 ») est utilisée. Si la condition concernant la normalité des résidus (fonction « Shapiro.test » du package « stats ») n'est pas respectée, un GLMM à distribution gamma (fonction « glmmTMB » du package « glmmTMB », argument family = Gamma) est alors employée. S'il s'agit de données quantitatives continues bivariées (i.e. éjection larvaire), un GLMM à distribution binomiale est utilisée (argument family = binomial). Un test de Kruskal-Wallis (fonction « kruskal_test » du package « Stats ») a été réalisé pour comparer les masses totales des larves produites entre traitements.

3.4.3 Effets des traitements sur le taux de corps gras

Des tests de Kruskal-Wallis (fonction « kruskal_test » du package « Stats ») ont été réalisés sur le ratio corps gras des ouvrières et des mâles afin d'étudier l'analyse de la variance, puisque les conditions de l'ANOVA n'étaient pas remplies. Les analyses ont été faites en fonction des traitements, du bloc, du sexe, des séries de manipulation et de leur date d'émergence.

Ensuite, des GLMM à distribution gamma (fonction « glmmTMB » du package « glmmTMB », argument family = Gamma) ont été réalisés afin de comparer les effets des différents traitements de phtalates sur les ouvrières, avec comme facteur fixe le traitement et le sexe, et comme facteur aléatoire la microcolonie imbriquée dans la colonie mère, ainsi que le bloc. Lorsqu'il y a significativité, un test à comparaison « pairwise » est réalisé (fonction « emmeans » du package « emmeans »).

CHAPITRE 4 : Résultats

Durant cette expérience, 80 colonies de 10 ouvrières ont été mises en place dans les conditions optimales d'élevages de *Bombus terrestris* durant 35 jours. Au total, 505 ouvrières ont été récupérées et 619 mâles ont été produits. En raison d'un problème de manipulation du bloc 1 ayant engendré une mortalité anormale après la première exposition au froid, uniquement les résultats du bloc 2 seront montrés et analysés. Les résultats globaux et les résultats du bloc 1 sont en annexes.

4.1 Mortalité

Sur les 400 bourdons installés en microcolonie, 123 ouvrières sont mortes durant la période d'élevage (Tab 3, Fig. 14) et 277 ont été récupérées. Les microcolonies traitées au DEHP 120 ng/g et au cocktail sont celles ayant eu le plus d'ouvrières mortes par microcolonie.

Tableau 3 : Résultats du nombre de mortes par traitement.

Traitement	Contrôle rien	Contrôle eau	Contrôle solvant	DEHP 12 ng/g	DEHP 120 ng/g	DnBP 60ng/g	DnBP 600 ng/g	Mix 120x60 ng/g
Nombre de mortes	9	11	13	14	23	19	11	23

La mortalité a été étudiée globalement ainsi qu'en séparant les deux blocs (Fig. 15 pour le bloc 2, voir annexes 7.3.1 pour l'analyse du bloc 1 et globale). Les analyses indiquent une forte significativité concernant le traitement cocktail (Régression Cox, $p = 0,00841$) et le traitement DEHP 120 ng/g (Régression Cox, $p = 0,01664$).

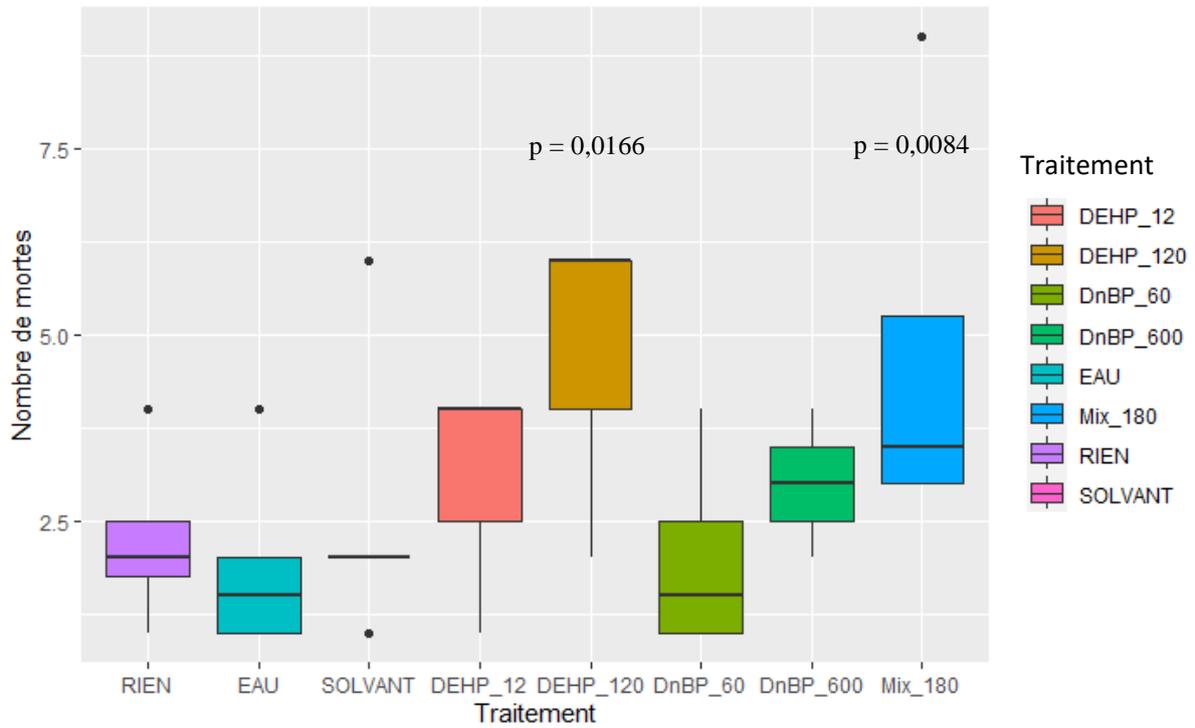


Figure 14 : Nombre de mortes par microcolonie du bloc 2 en fonction des traitements. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR), les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. Nombre de colonies par traitement = 5). Les p-value sont obtenues en comparaison avec le contrôle « solvant ».

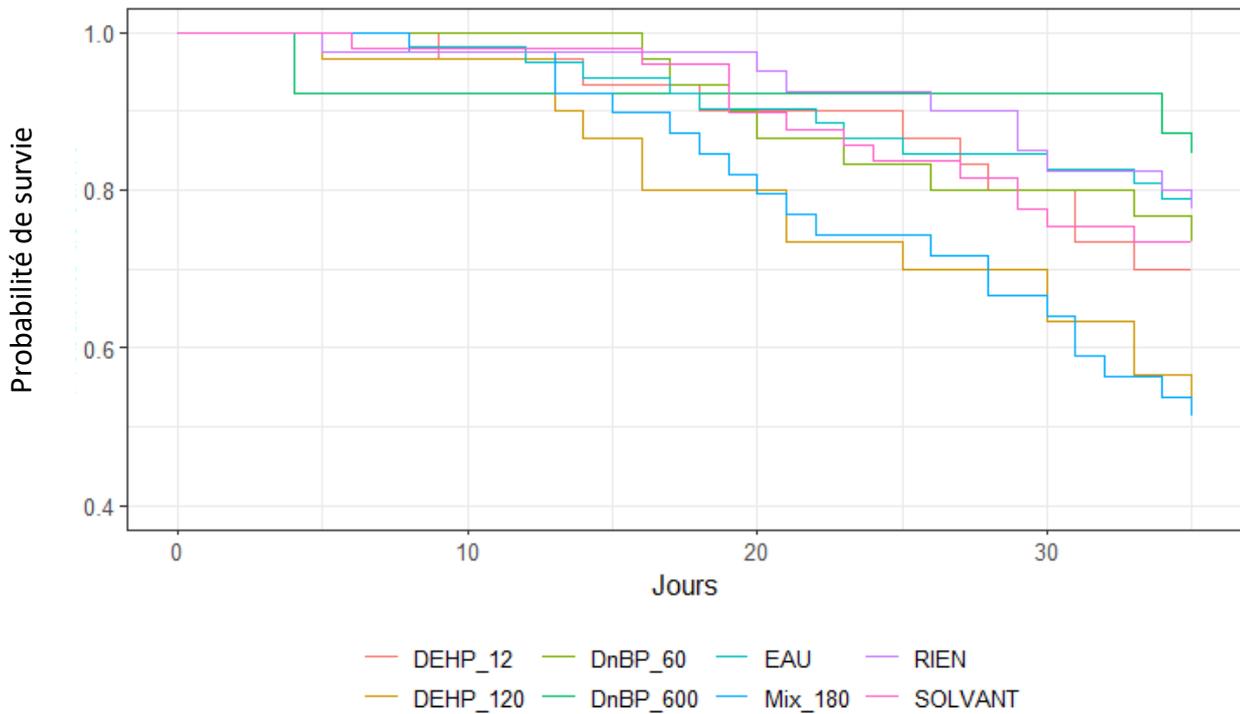


Figure 15 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières. Probabilité de survie des ouvrières en fonction des différents traitements. Noter que l'échelle a été modifiée (0,35-1). Nombre de colonies par traitement = 5.

4.2 Consommation des ressources et développement du couvain

Consommation des ressources : La consommation totale de pollen ne diffère pas significativement au sein des microcolonies exposées aux différents traitements (Fig. 16, Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 4,9721$, $df = 7$, $p = 0,6634$), ni en fonction du bloc (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 0,3202$, $df = 1$, $p = 0,571$). Après un GLMM sur la consommation de pollen, on a détecté que le traitement impacte significativement la consommation des ouvrières (GLMM, $\chi^2 = 14,538$, $df = 7$, $p = 0,0424$). Après un test à comparaison deux à deux, les ouvrières du traitement DnBP 60 ng/g ont consommé plus de pollen que les ouvrières du traitement cocktail ($p = -0,0192$, $estimate = 1,4636$). La dilution pollinique n'a révélé aucune différence significative entre les traitements (GLMM, $\chi^2 = 5,512$, $df = 7$, $p = 0,5977$), de même concernant l'efficacité pollinique (LMM, $\chi^2 = 9,389$, $df = 7$, $p = 0,2259$).

La collecte de sirop ne diffère pas significativement selon le traitement (Fig. 17, Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 22,899$, $df = 7$, $p = 0,471$), mais c'est le cas selon le bloc (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 21,9717$ $df = 1$, $p < 0,001$). La collecte de sirop entre les différents traitements ne révèle pas de différence significative (GLMM, $\chi^2 = 4,0583$, $df = 7$, $p = 0,773$).

Production du couvain : Chaque traitement contient les différents stades de développement comprenant les œufs, les larves non-isolées, les larves isolées pré-défécation, les larves isolées post-défécation, les pupes, les mâles non-émergés et les mâles émergés. La masse totale des larves produites a révélé une différence significative entre les traitements (Fig. 18, GLMM, $\chi^2 = 15,641$, $df = 7$, $p = 0,0286$). Cependant, un test post-hoc à comparaison multiple deux à deux n'indique de différence significative qu'entre le contrôle « rien » et le traitement cocktail ($p = 0,0230$).

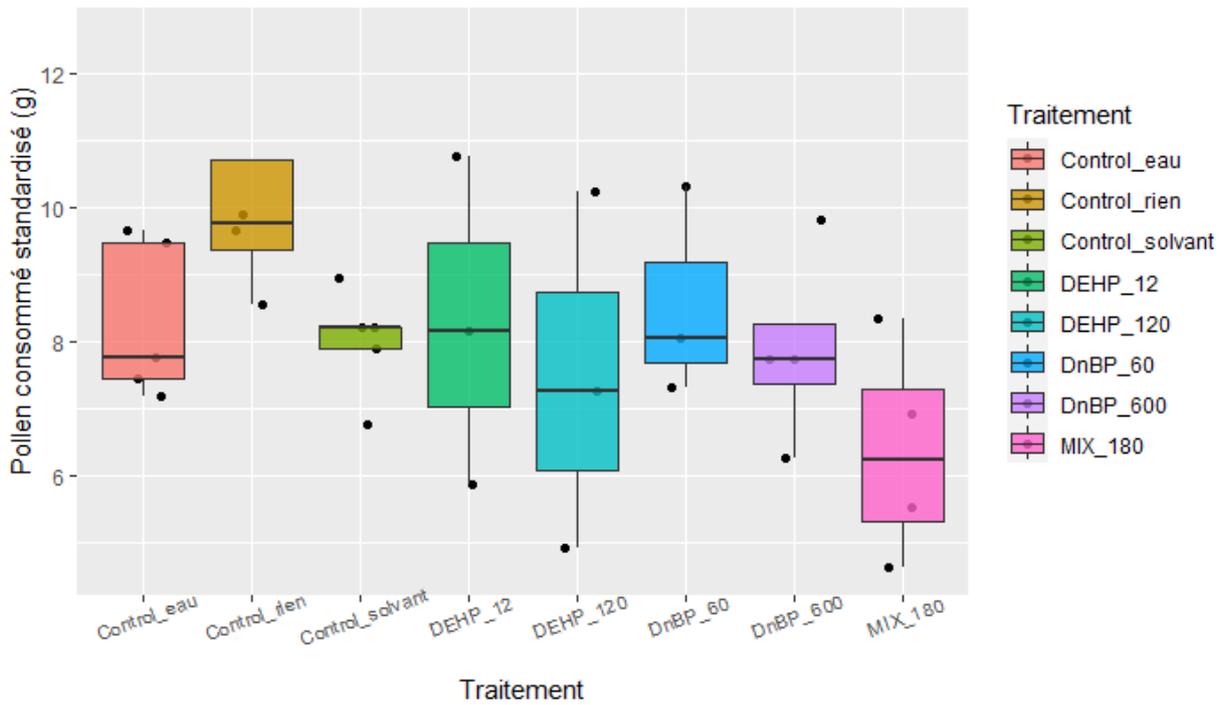


Figure 16 : Consommation de pollen du bloc 2 par traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain (n = 5). La différence de consommation de pollen entre les traitements n'est pas significative (p = 0,6634).

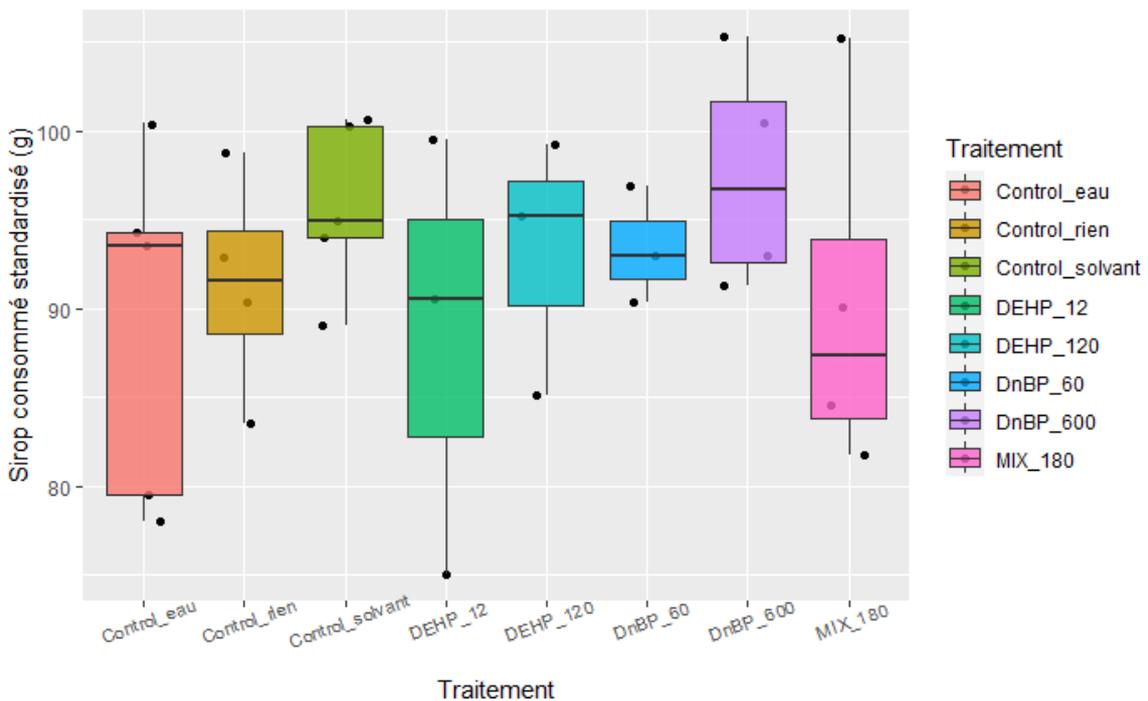


Figure 17 : Consommation de sirop du bloc 2 par traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain (n = 5). La consommation de pollen entre les traitements ne varie pas significativement (p = 0,471).

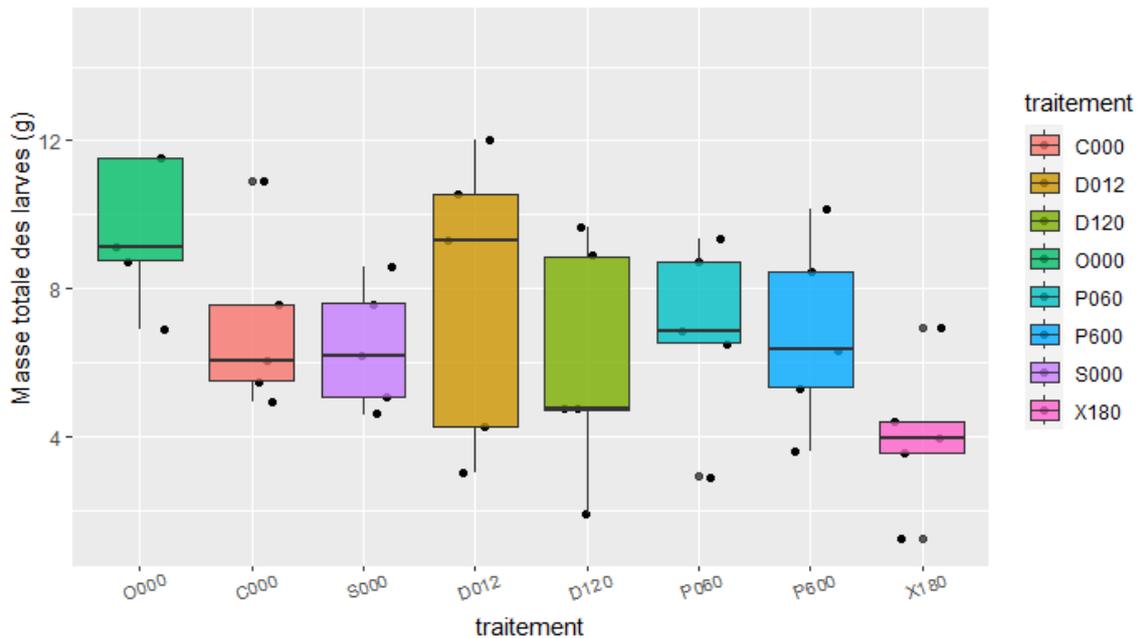


Figure 18 : Masse totale des larves en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). (n = 5). Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. Uniquement la différence entre le traitement cocktail (X180) et le contrôle « rien » est significative (p = 0,0230).

En analysant le nombre (Fig. 19) et la masse (Fig. 20) des différents stades de développement, le nombre d'œufs ne varie pas significativement selon le traitement (GLMM, χ^2 5,2763, df = 7, p = 0,6263), et aucune différence n'a été détectée entre les traitements concernant le recensement des larves non-isolées (GLMM, χ^2 = 4,3578, df = 7, p = 0,7378), ni sur leur masse (GLMM, χ^2 = 3,997, df = 7, p = 0,7801).

Nous avons découvert que le nombre des larves pré-défécation des différents traitements varient presque significativement (GLMM, χ^2 = 12,602, df = 7, p = 0,08242). Après un test post-hoc à comparaison multiple, il s'avère que le traitement cocktail a un nombre réduit de larves pré-défécation (p = 0,0416, estimate = 1,541) par rapport au contrôle « rien ». Cependant, la masse des larves pré-défécation ne varie pas significativement selon les traitements (GLMM, χ^2 = 8,9071, df = 7, p = 0,2594).

Aucune différence significative n'a été détectée entre les différents traitements sur le nombre des larves post-défécation (GLMM, χ^2 = 7,3768, df = 7, p = 0,3907). Par contre, il a été détecté que leur masse varie significativement selon les traitements (GLMM, χ^2 = 16,873, df = 7, p = 0,01823). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, la masse des larves post-défécation du traitement DnBP 600 ng/g est significativement supérieure au traitement DEHP120 ng/g (p = 0,0382, estimate = -0,3513).

Aucune différence significative n'a été détectée sur le nombre des pupes au sein des différents traitements (GLMM, $\chi^2 = 7,58$, $df = 7$, $p = 0,3711$). On a découvert une différence significative entre les masses des pupes (GLMM, $\chi^2 = 42,002$, $df = 7$, $p < 0,001$). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, il s'avère que la masse des pupes du traitement DEHP 120 ng/g est inférieure à la masse des pupes du traitement DEHP 12 ng/g ($p = 0,0443$, estimate = 0,1226). La masse des pupes du traitement DEHP 120 ng/g est significativement supérieure au traitement DnBP 600 ng/g ($p = 0,0051$, estimate = 0,1559) et au traitement DnBP 60 ng/g ($p = 0,0561$, estimate = -0,11581).

La différence entre le nombre de mâles non-émergés entre les traitements est significative (GLMM, $\chi^2 = 23,821$, $df = 7$, $p = 0,0012$). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, les traitements DnBP 60 ng/g et 12 ng/g ont produit moins de mâles non-émergés que le contrôle « rien ». Nous avons également détecté des différences significatives entre les traitements sur la masse des mâles non-émergés (LMM, $\chi^2 = 18,485$, $df = 7$, $p = 0,0099$). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, la masse des mâles non-émergés du traitements DnBP 600 ng/g est significativement supérieure par rapport à la masse des mâles non-émergés du contrôle « rien » ($p = 0,0190$, estimate = -0,07068).

Le nombre de mâles émergés a révélé que le traitement cocktail a produit significativement moins de mâles (Tab. 4, GLMM, $\chi^2 = 15,932$, $df = 7$, $p = 0,0257$). L'ANOVA sur la masse des mâles n'a pas révélé d'impact significatif par rapport aux différents traitements (Fig. 21). Il n'y a pas de différence significative entre les masses des mâles des différents traitements (GLMM, $\chi^2 = 11,434$, $df = 7$, $p = 0,1208$).

Tableau 4 : table regroupant le nombre de mâles émergés dans chaque traitement.

Traitement	Contrôle rien	Contrôle eau	Contrôle solvant	DEHP 12 ng/g	DEHP 120 ng/g	DnBP 60ng/g	DnBP 600 ng/g	Mix 120x60 ng/g
Mâles produits (global)	92	84	86	75	55	98	58	69
Mâles produits (bloc 1)	44	33	25	30	21	45	27	54
Mâles produits (bloc 2)	48	59	53	45	34	53	31	15

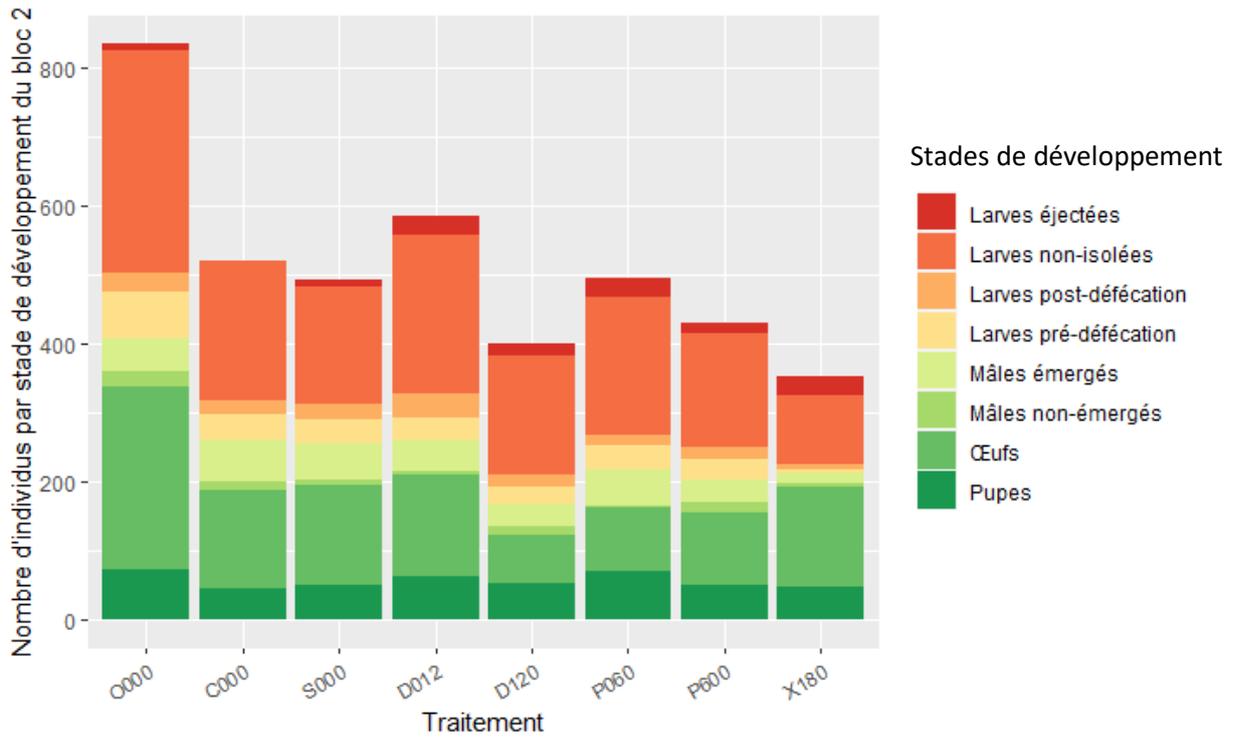


Figure 19 : Nombre d'individus du bloc 2 par stade de développement en fonction du traitement. Graphique en bar représentant l'occurrence de chaque stade de développement par traitement. (n = 5). Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail.

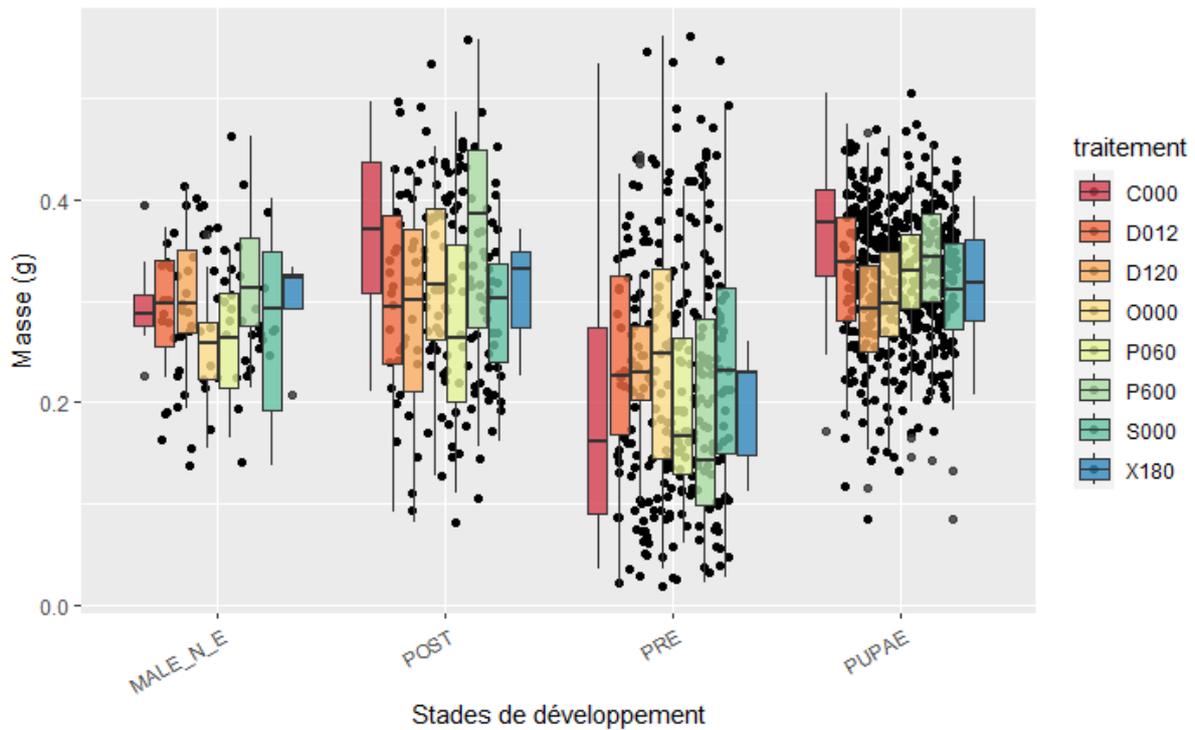


Figure 20 : Masse des différents stades de développement en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain, les points extérieurs à l'espace inter-quartile

représentent quelques valeurs extrêmes. Les types de larves sont : larve prédéfécatoire (PRE), larve postdéfécatoire (POST), pupae (PUPAE) et mâles non-émergés (MALE_N_E). Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. (n = 5).

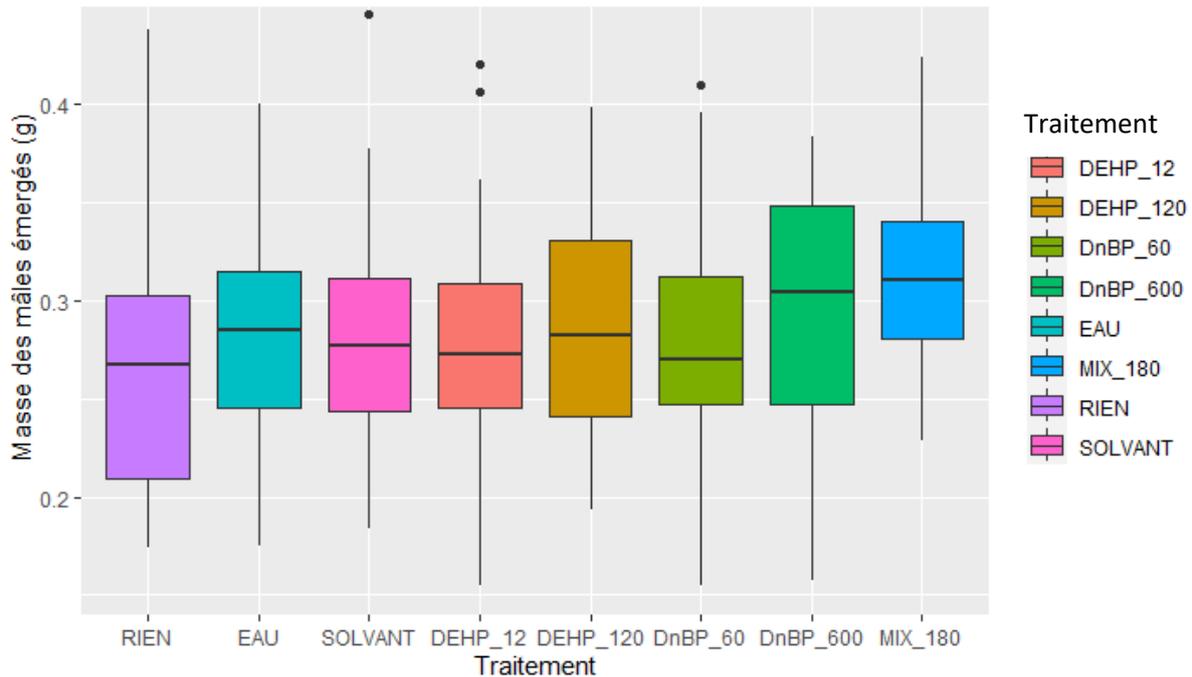


Figure 21 : Masse totale des mâles émergés en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). (n = 5). La différence sur la masse des mâles selon les traitement n'est pas significative (p = 0,1208).

Concernant le taux d'éjection larvaire, une différence significative entre les traitements a été détectée (GLMM, $\chi^2 = 15,392$, df = 7, p = 0,0313). Le test post-hoc à comparaisons multiple a révélé que les ouvrière du traitement DEHP 12 ng/g rejetaient plus leur larves de façon significative par rapport au contrôle solvant (p = 0,0325, estimate = 23,47), ce qui est aussi le cas pour le traitement cocktail (p = 0,0125, estimate = 26,68), et les ouvrières du traitement DEHP 120 ng/g éjecteraient presque significativement plus de larves par rapport au contrôle « solvant » (p = 0,085, estimate = 19,45).

4.3 Effets des traitements sur le taux de corps gras

Le taux corps gras de 139 ouvrières (soit environ deux ouvrières par microcolonie lorsque la mortalité le permettait) et de 618 mâles ont été analysés.

Les tests de Kruskal-Wallis sur le ratio corps gras des ouvrières n'a révélé aucun impact significatif des différents traitements sur le taux de corps gras des bourdons (df = 7, p = 0,577). Cependant, il a révélé que le bloc (Kruskal-Wallis, df = 1, p = 0,00811) ainsi que le sexe des

bourdons ($df = 1$, $p < 0,0001$) avaient un impact significatif sur le taux de corps gras (les résultats globaux et du bloc 1 sont en annexes 7.2.3). En comparant les traitements à l'aide d'un GLMM, il a été détecté une augmentation presque significative du traitement DnBP 600 ng/g comparé à la dose inférieure de DnBP (GLMM, $\chi^2 = 12,523$, $df = 7$, $p = 0,0774$) mais pas par rapport au contrôle « solvant ». La comparaison des corps gras en fonction du sexe s'est révélée significative où les mâles ont beaucoup plus de corps gras (entre 20 et 30%) que les femelles (entre 10 et 20%) ($\chi^2 = 210,522$, $df = 1$, $p < 0,001$). De ce fait, le corps gras des mâles et des femelles ont été analysés séparément (Fig. 22).

Le taux de corps gras des bourdons mâles n'est pas significativement différent en fonction du traitement (GLMM, $\chi^2 = 11,713$, $df = 7$, $p = 0,1104$). En comparant les mâles premier émergés et derniers émergés, la différence du taux de corps gras n'est pas significative (Kruskall-Wallis, $df = 1$, $p = 0,183$), ni en comparant le taux de corps gras des mâles pondus avant et des mâles pondus après la première exposition (Kruskall-Wallis, $df = 1$, $p = 0,275$), ni en comparant le taux de corps gras des derniers mâles émergés entre-eux (Kruskall-Wallis, $df = 7$, $p = 0,715$). Ces comparaisons ont été faites uniquement selon la date d'émergence et le taux de corps gras.

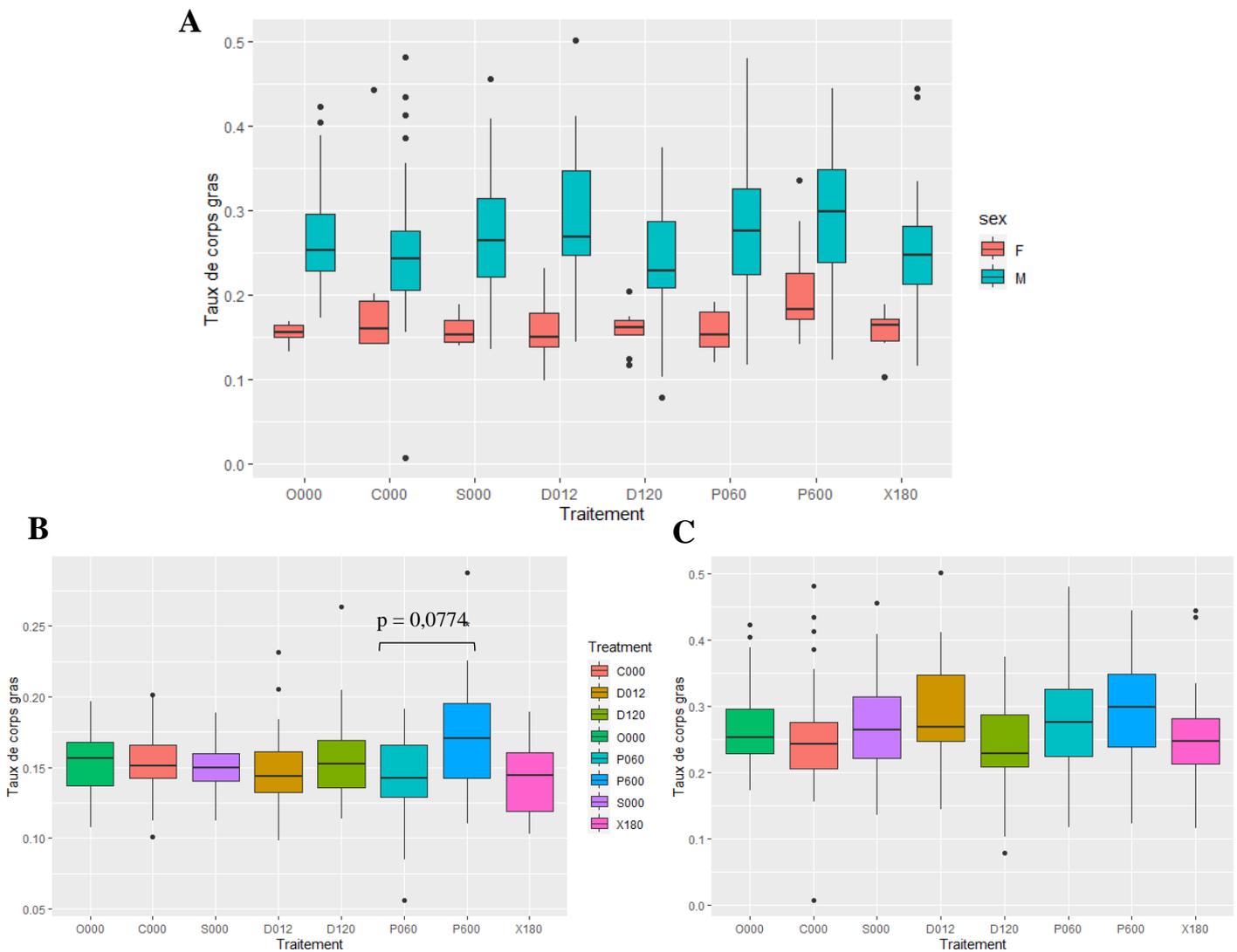


Figure 22 : Taux de corps gras des bourdons. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. (n = 5). Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. **A.** Taux de corps gras des ouvrières et des mâles émergés en fonction des traitements. **B.** Taux de corps gras des femelles. **C.** Taux de corps gras des mâles.

CHAPITRE 5 : Discussion des résultats et conclusions générales

Via un protocole d'exposition topique d'ouvrières de *Bombus terrestris*, nous avons pu montrer que le traitement DEHP 120 ng/g induit une surmortalité environ égale à celle du traitement « cocktail », que le taux de corps gras des ouvrières traitées au DnBP 600 ng/g est plus haut que la dose inférieure et que certains stades larvaires ont subi des différences de masse ou de nombre durant le développement.

5.1 Impact des traitements sur la mortalité

Durant cette expérience, plusieurs facteurs de stress ont été pris en compte, dont la mortalité des abeilles et le taux d'éjection larvaire.

Les résultats sur la mortalité des abeilles ont indiqué une mortalité significativement plus importante chez les abeilles traitées au DEHP seul ou en cocktail à dose de 120 ng/g par rapport aux traitements contrôles « eau/solvant/rien », mais pas de mortalité significative concernant les différentes doses de DnBP. L'impact du DEHP sur la mortalité a été étudié sur d'autres espèces d'invertébrés, dont les larves de la noctuelle méditerranéenne (*Spodoptera littoralis*) ayant subi une mortalité environ 30% plus élevée par rapport au contrôle, suite à une exposition chronique du DEHP à une concentration de 4,3 mg/g de nourriture. Cependant, il est important de préciser que les individus traités sont les larves, et ont été exposés par voie orale et non topique (Avilès *et al.*, 2019). Dans notre design expérimental, les individus traités étaient les adultes, il serait donc intéressant d'également étudier la mortalité sur les larves individuellement. C'est également le cas chez le nématode *Caenorhabditis elegans* où 14 jours d'exposition topique et chronique à 1 μ M de DEHP induit une surmortalité (Pradhan *et al.*, 2017), et chez la grande daphnie (*Daphnia magna*) où son taux de survie baisse après une exposition chronique à 811 μ g/L de DEHP (Knowles *et al.*, 1987). Cependant, une précédente expérience du projet ASPI (non-publiée à ce jour) d'exposition topique aigüe a révélé une mortalité individuelle des ouvrières de *Bombus terrestris* traitées individuellement après avoir été traitées au DnBP à 60 et à 600 ng/g à court terme, mais pas de mortalité significative des abeilles pour les différentes doses de DEHP. C'était également le cas chez le diptère *Chironomus riparius* traité au BBP à une concentration 100 mg/L durant 24h, chez qui la probabilité de survie a diminué de presque 60% par rapport au contrôle (Planellò *et al.*, 2011). La cause de mortalité étudiée chez *C. elegans* serait une diminution de l'expression de gènes

impliqués dans la réponse au stress cellulaire, ainsi que l'augmentation d'expression de gènes liés au stress oxydatif et à l'apoptose (Pradhan *et al.*, 2017).

Une hypothèse pouvant expliquer les résultats de mortalité obtenu serait que le DnBP aurait un impact sur la mortalité à court terme lorsque l'individu est isolé, mais cette toxicité pourrait être tamponnée par la présence du reste de la microcolonie, comme c'est parfois observés avec la toxicité d'autres produits tels que les néonicotinoïdes sur ces espèces sociales (Crall *et al.*, 2019). Tandis que le DEHP aurait plutôt un impact après un certain nombre d'application malgré l'effet tampon de la colonie. Le DEHP n'aurait donc pas de toxicité aiguë à court terme chez les abeilles contrairement aux études sur les invertébrés marins (Staples *et al.*, 1997).

Ces différents résultats sur la mortalité suggèrent que l'effet colonial chez les espèces sociales tel que *Bombus terrestris* pourraient influencer les effets du DnBP en diminuant la toxicité. Cependant, le DEHP semblerait engendrer de la mortalité après une période d'exposition chronique, et ce, malgré la présence de la microcolonie.

De plus, des effets synergiques entre deux molécules sont possibles et peuvent impacter les abeilles. C'est le cas par exemple d'un cocktail de fongicide imasalil et l'insecticide fipronil induisant une surmortalité chez *Bombus terrestris* par rapport à l'utilisation isolée des molécules (Raimets, *et al.*, 2018b). Les phtalates sont également susceptibles d'avoir des effets synergiques (Svingen & Vinggaard, 2016). Le traitement « cocktail » (DEHP 120 ng/g et DnBP 60 ng/g) ne semble pas induire de synergie entre les deux molécules de phtalates. En effet, la dose de 120 ng/g de DEHP en mélange dans un cocktail avec du DnBP présente un taux de mortalité semblable à celui du DEHP 120 ng/g seul.

Il est également important de savoir que le DEHP et le DnBP ne sont pas les seules molécules retrouvées dans le milieu naturel. Comme indiqué notamment par des mesures atmosphériques et cuticulaire prises au sein de la Métropole européenne de Lille dans le cadre du projet ASPI (non publiées à ce jour), les bourdons peuvent être exposés à des cocktails complexes de différents phtalates tels que le DNOP, DINP, ou encore DPP, par exemple, qui pourraient engendrer des effets cocktails entre-eux ou avec nos phtalates testés.

Enfin, les résultats sur le recensement des larves éjectées indiquent que les abeilles traitées au DEHP 12 ng/g, 120 ng/g et au cocktail ont rejeté plus de larves en cours de développement que les autres traitements. L'effet chronique du DEHP semble être une source de stress engendrant de la mortalité des ouvrières ainsi que le rejet des larves, suggérant soit un impact comportemental des ouvrières ayant tendance à rejeter plus de larves en réponse à un stress

(Pomeroy & Plowright, 1979 ; Fisher et Pomeroy, 1989), soit un problème de développement larvaire induisant une mortalité plus importante.

5.2 Effets sublétaux des traitements

Le nombre total des différents stades larvaires produits montre clairement une baisse pour tous les traitements et les contrôles « eau » et « méthanol » comparés au contrôle « rien ». Ce traitement contrôle « rien » est le seul à ne pas avoir subi d'endormissement au froid durant les 35 jours d'élevage. En effet, le froid est une source de stress pour les abeilles (Owen *et al.*, 2013), suggérant que le stress lié au froid induit une baisse de production du couvain.

La masse totale des différents stades de développement n'a révélé de différence qu'entre les larves du traitement « cocktail » et celles du contrôle « rien ». Cependant, le traitement cocktail a tout de même eu tendance à produire moins de larves que les autres traitements, et par conséquent une masse larvaire totale plus faible (Fig. 20). De plus, ce traitement contient très peu de larves pré-défécation et de larves post-défécation. Les traitements DEHP 120 ng/g et « cocktail » produisent un peu moins de larves que les autres traitements, bien que cette différence ne soit pas significative. Puisque le « cocktail » et le traitement DEHP à la dose plus élevée ont engendré de la mortalité, ces résultats pourraient être dû à cette mortalité en induisant l'absence de certains stades larvaires pour les microcolonies les plus impactées. Comme on sait également que le DEHP a déjà impacté la ponte des reines de fourmi *Lasius niger* à concentration de 2 ng/ μ L (Cuvillier *et al.*, 2014), cela pourrait aussi être une des explication à la diminution du nombre de larves traités au DEHP.

Selon Avilès *et al.* (2019), les larves de la noctuelle *Spodoptera littoralis* ont montré un poids réduit à forte dose de DEHP (4,3 mg/g de nourriture) par rapport au contrôle et aux autres conditions, et le taux de DEHP dans les pupes et les adultes est significativement plus important que dans les autres stades larvaires, pouvant éventuellement impacter le développement. Une étude sur la grande Daphnie (*Daphnia magna*) a également révélé une diminution de la taille du corps suite à l'exposition au DEHP et au DnBP 1 et 10 μ M (Seyoum *et al.*, 2019). Dans les cas de la noctuelle et de la daphnie, un impact plus important du DEHP s'observe dans les stades larvaires terminaux, induisant une diminution de la masse des pupes. Chez *Bombus terrestris*, les pupes du traitement à forte dose de DEHP ont aussi une masse plus faible que celles du traitement de DEHP à 12 ng/g. Toutefois, les mâles émergés de ce traitement n'ont pas une masse significativement différente des autres mâles, ce qui pose question : comment des imagos de masse normale peuvent-ils émerger de pupes de moindre masse ?

Les effets des phtalates sur le développement larvaire semble varier selon les espèces et les phtalates employés. Par exemple, le DnBP à concentration de 0,25 mL/L de nourriture a induit un temps de pupation plus court chez la drosophile, tandis qu'une concentration de 1 mL/L a induit un temps de pupation plus long (Atli, 2010). Dans l'étude d'Atli, ce sont les larves qui ont été exposées aux phtalates et non les adultes. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que les phtalates peuvent altérer la voie des ecdystéroïdes. Cette voie est impliquée dans le développement larvaire et la mue des arthropodes (Gruntenko & Rauschenbach, 2008). D'après Atli (2010), le phtalate de DnBP pourrait s'attacher aux récepteurs nucléaires de la voie des ecdystéroïdes et perturber le développement larvaire.

Les graphiques (Fig. 16, 17) montrent que les colonies traitées au traitement cocktail ont tendance à consommer moins de pollen et de sirop. Les colonies de ce traitement ont subi une forte mortalité par rapport aux autres traitements, ce qui expliquerait la faible consommation en ressources alimentaires et le faible nombre de larves produites. De plus, bien que ce ne soit pas significativement différent, les ouvrières traitées à fortes doses de DEHP et de DnBP semblent avoir tendance à consommer plus de sirop et moins de pollen que les colonies traitées aux doses inférieures. Le même cas a été observé en comparant les colonies du contrôle « eau » et les colonies du contrôle « solvant ». Cela suggère que le solvant et les fortes doses de phtalates pourraient induire une augmentation de consommation des ressources alimentaires chez les colonies traitées. Au vu du faible nombre de réplicas, on ne peut tirer de conclusion sur la consommation des ressources. Cependant, si on compare avec *Chironomus riparus* traité au DEHP, le comportement d'alimentation des moustiques n'a pas été impacté (Cao *et al.*, 2016).

Impacts physiologiques

Le corps gras est un acteur majeur de la production de lipides, de la réponse immunitaire et de la synthèse des précurseurs d'agents de la voie des ecdystéroïdes (Gillespie *et al.*, 1997 ; Fowler *et al.*, 2020. Rosales, 2017). Sa modification par les phtalates pourrait avoir des impacts physiologiques et, par conséquent, des impacts comportementaux. Cela pourrait conduire à un stress physiologique chez les abeilles traitées. En effet, le DEHP a des effets à court terme sur des gènes immunitaires exprimés dans le corps gras. C'est le cas de la défensine (petit peptide permettant de dénaturer les membranes bactériennes) qui est sur-exprimée dans le corps gras des fourmis, ainsi que la vitellogénine après exposition de DEHP à une dose de 1ng/μL (Cuvillier *et al.*, 2014). Dans notre cas, les prélèvements des corps gras s'est réalisée après plusieurs sessions d'exposition chronique mais également quelques jours après la dernière

exposition. Cela pourrait influencer l'expression des gènes impliqués dans l'immunité des abeilles comme l'ont étudié Cuvillier *et al* (2014).

Durant notre expérience, nous avons évalué le taux de corps gras des ouvrières et des mâles émergés après chaque traitement afin d'estimer l'impact physiologiques des deux phtalates testés, séparément ou en cocktail. Il apparaît que le taux de corps gras des bourdons mâles est significativement plus grand que celui des femelles, mais que l'interaction entre le sexe et le traitement n'a pas davantage d'impact. En effet, les mâles présentent un taux de corps gras bien supérieur à celui des femelles (10-20% femelles, 20-30% mâles). A contrario, lors de la toute première expérience d'extraction de corps gras des bourdons mâles réalisée par Gekière (2021), les mâles avaient moins de corps gras que les femelles, soit l'inverse de nos résultats. L'hypothèse de Gekière est que les femelles plus âgées ont pu produire plus de corps gras tout au long de la durée d'élevage. Cependant, une autre expérience montre quant à elle que les abeilles âgées ont un taux de corps gras plus faible (Erin *et al.*, 2020).

En analysant les sexes séparément, nous avons découvert que les ouvrières traitées au DnBP 600 ng/g ont un taux de corps gras presque significativement plus haut que celles traitées au DnBP 60 ng/g, mais pas par rapport au traitement contrôle. Le taux de corps gras des mâles émergés a aussi été analysé. On a étudié la différence du taux de corps gras entre les mâles pondus avant et après la première exposition et entre mâles premiers émergés et derniers émergés. Aucun résultat concret n'est ressorti de ces analyses. Dans la littérature mentionne que le DEHP augmente la teneur en graisse chez différentes espèces (Zu *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2017), dont *Daphnia magna* qui augmente son taux de graisse suite à une exposition au DEHP et au DBP. Nos résultats sur le DEHP indiquent qu'il n'impacte pas le taux de corps gras des ouvrières ni des mâles. Il est probable que l'analyse du taux de corps gras ne nous permette pas de déterminer efficacement si la physiologie des abeilles est réellement impactée ou non.

5.3 Perspectives

Lors de l'étude de mortalité que nous avons menée, la vague importante de froid que les ouvrières du bloc 1 ont subi suite à une erreur de manipulation lors de la première exposition, a réduit le nombre individus étudiés. De ce fait, les analyses globales ont pu être biaisées et nous font regarder les résultats de ce groupe avec circonspection. Suite à cette mortalité importante observée chez les abeilles du bloc 1, cette expérience devrait être reproduite avec un nombre plus important d'individus et en réduisant le plus possible les chocs thermiques que subissent les abeilles lors de l'endormissement par le froid, comme effectué avec le bloc 2. Cela permettrait d'ajouter des répliques aux différentes analyses, et ainsi de maximiser l'étude de

l'impact des phtalates sur la mortalité. L'endormissement au CO₂ est aussi une méthode d'anesthésie utilisée chez les abeilles qui aurait pu être utilisée pour limiter l'effet du froid, mais elle a comme inconvénient d'engendrer des modifications métaboliques et comportementales (Amsalem & Grozinger, 2017). Une autre méthode pourrait être de ne pas endormir les abeilles lors de l'application topique en les maintenant en cage de maintien afin d'appliquer le traitement. Cependant, une exposition orale pourrait être envisagée afin d'éviter cette source de stress.

Afin de limiter l'impact du protocole d'exposition tout en étudiant l'impact des phtalates sur les abeilles en situation un peu plus réaliste, une deuxième perspective de cette étude serait de réaliser la même expérience en permettant aux individus d'aller eux-mêmes au contact de la source de contamination aux phtalates. Cela permettrait d'évaluer si l'impact des phtalates est plus important lorsque les abeilles sont sollicitées pour rechercher activement leur nourriture. Cela permettrait aussi d'évaluer les impacts physiologiques et de déterminer si les abeilles rencontrent des difficultés à s'alimenter, les phtalates pouvant agir sur les voies liées à l'olfaction chez les invertébrés (Avilès *et al.*, 2019). Différentes techniques permettraient de comparer les sensibilités olfactives des abeilles soumises ou non à une exposition aux phtalates. Par exemple, on retrouve l'utilisation d'olfactomètres ou d'imagerie des glomérules olfactifs comme employé par Sandoz (2011) afin d'étudier le comportement et la neurophysiologie de la perception olfactive et de l'apprentissage chez l'abeille domestique.

Dans la nature, la plupart des nids d'abeilles solitaires se retrouvent principalement dans le sol, ce qui les expose fortement aux polluants urbains et aux pesticides présents dans les sols (Sgolastra *et al.*, 2018). Les abeilles eusociales construisent principalement leurs cellules et pots à pollen en composés lipidiques tels que les cires (Michener, 2007). Les nids pourraient donc être des pièges à substances lipophiles comme les phtalates, soumettant les larves aux polluants tout au long de leur développement. Au cours de cette étude, ce sont les adultes qui ont été exposés. Pourtant dans nos résultats, les colonies traitées au DEHP et au cocktail ont rejeté plus de larves que les autres traitements. Cependant, les abeilles sauvages ne bénéficient pas toujours de cet aspect colonial et pourraient être plus affectées. C'est pourquoi il serait intéressant de tester également à l'échelle individuelle, afin de comparer avec les effets coloniaux.

Suite à nos résultats sur le développement larvaire des abeilles et pour investiguer l'effet des phtalates directement sur les larves, une troisième perspective de l'étude serait de contaminer les larves des différents stades larvaires individuellement afin de déterminer si leur éjection est due à la mort des larves ou à un changement de comportement des abeilles. Cela permettrait

également d'étudier les effets des phtalate sur le temps de métamorphose, la qualité de la mue ou encore la mortalité individuelle pour chaque stade comme effectué sur *Spodoptera littoralis* (Avilès *et al.*, 2019).

A la suite de nos expériences, les tissus prélevés sur les individus contaminés seront analysés afin d'étudier l'expression des gènes de la voie des ecdystéroïdes (par exemple EcR, USP, E75, 78C) et de l'immunité (par exemple AADAT, LLDH, Defensin1, Abaecin), permettant ainsi de déterminer si les phtalates ont un impact physiologique sur *Bombus terrestris*. En effet, l'expression de gène du récepteur nucléaire EcR impliqué dans la voie des ecdystéroïdes a été diminuée suite à une exposition au DEHP de *Chironomus riparus* (Planelló *et al.*, 2011). Une étude bactériologique de l'hémolymphe permettra aussi d'évaluer la réponse immune des abeilles face aux traitements. Ces analyses permettront alors de mieux comprendre les impacts physiologiques des phtalates sur les abeilles de nos expériences.

Il est à noter également que lors de nos dissections, pratiquement toutes les abeilles disséquées possédaient des ovaires développés. Cela signifie que plusieurs ouvrières étaient aptes à pondre dans chaque microcolonie. Selon plusieurs études, différentes espèces subissent des malformations des gonades par le DEHP (Adeogun *et al.*, 2018). Dans ce cas, soit les ouvrières sont plusieurs à pondre naturellement dans les microcolonies contrairement à ce qui est considéré, soit le DEHP a un impact sur les gonades des femelles. Dans notre expérience, nous avons remarqué que toutes les microcolonies possédaient plusieurs femelles avec des gonades développées mais l'information n'a pas été encodée. D'avantage d'études seraient donc nécessaires afin de mieux comprendre si les phtalates ont réellement joué un rôle sur le développement des ovaires des ouvrières.

5.4 Conclusion

Il est important de rappeler que l'utilisation des phtalates comme plastifiant a augmenté considérablement depuis ces dernières décennies, induisant une pollution environnementale non négligeable et différents impacts probables sur un bon nombre d'espèces animales. La cuticule lipophile des insectes permet aux phtalates atmosphériques de pénétrer dans le corps de l'organisme, engendrant une exposition importante des insectes à ces polluants urbains sur le long terme. Cette étude permet d'avoir une approche de l'impact des phtalates de DEHP et de DnBP à deux différentes doses sur la santé coloniale et individuelle de *Bombus terrestris*. Nos résultats nous ont dévoilé que le DEHP à la plus forte dose induisait une mortalité importante, sans interaction synergique avec le DnBP du cocktail. De plus, la production du couvain est principalement impactée par la forte dose de DEHP, produisant moins de larves et

rejetant plus de larves que les autres traitements. Sachant que la faune sauvage est continuellement exposée aux phtalates présents dans l'environnement, davantage d'études seraient nécessaires pour mieux comprendre leurs voies d'action physiologiques dans le cadre du déclin des abeilles, ainsi que sur davantage d'invertébrés terrestres tout autant exposés à ces polluants urbains.

CHAPITRE 6 : Références

- Adeogun, A.O., Ibor, O.R., Imiuwa, M.E., Omogbemi, E.D., Chukwuka, A.V., Omiwole, R.A., Arukwe, A., 2018. Endocrine disruptor responses in African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to di-(2-ethylhexyl)-phthalate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 213, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.07.001>.
- Ahrné, K., Bengtsson, J., & Elmqvist, T. (2009). Bumble Bees (*Bombus* spp) along a Gradient of Increasing Urbanization. *PLOS ONE*, 4(5), e5574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005574>
- Anatomie interne | L'Abeille du Forez.* (s. d.). <http://abeilleduforez.tetraconcept.com/divers/biologie-de-labeille/anatomie-interne/>
- Amsalem, E., Grozinger, C. M., Padilla, M., & Hefetz, A. (2015). The Physiological and Genomic Bases of Bumble Bee Social Behaviour. *Advances in Insect Physiology*, 37-93. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2015.01.001>
- Amsalem, E., & Grozinger, C. M. (2017). Evaluating the molecular, physiological and behavioral impacts of CO2 narcosis in bumble bees (*Bombus impatiens*). *Journal of Insect Physiology*, 101, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.06.014Q>
- Andersen, S. O. (1979). Biochemistry of Insect Cuticle. *Annual Review of Entomology*, 24(1), 29-59. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.000333>
- Arulanandam, C.D., Hwang, JS., Rathinam, A.J. *et al.* Evaluating different web applications to assess the toxicity of plasticizers. *Sci Rep* 12, 19684 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18327-0>
- Atlı, E. (2010). The effects of dibutyl phthalate (DBP) on the development and fecundity of *Drosophila melanogaster*. *Research Gate*. <https://acikerisim.nevsehir.edu.tr/handle/20.500.11787/1847>
- Aviles, A., Boulogne, I., Durand, N., Maria, A., Da Silva Cordeiro, A. F., Bozzolan, F., Goutte, A., Alliot, F., Dacher, M., Renault, D., Maïbèche, M., & Siaussat, D. (2019). Effects of DEHP on post-embryonic development, nuclear receptor expression, metabolite and ecdysteroid concentrations of the moth *Spodoptera littoralis*. *Chemosphere*, 215, 725-738. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.102>
- Aviles, A., Da Silva Cordeiro, A. F., Maria, A., Bozzolan, F., Boulogne, I., Dacher, M., Goutte, A., Alliot, F., Maïbèche, M., Massot, M., & Siaussat, D. (2020). Effects of DEHP on the ecdysteroid pathway, sexual behavior and offspring of the moth *Spodoptera littoralis*. *Hormones and Behavior*, 125, 104808. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104808>
- Baldock, K. C. R., Goddard, M. A., Hicks, D. M., Kunin, W. E., Mitschunas, N., Osgathorpe, L. M., Potts, S. G., Robertson, K. M., Scott, A. V., Stone, G. N., Vaughan, I. P., & Memmott, J. (2015). Where is the UK's pollinator biodiversity? The importance of urban areas for flower-visiting insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1803), 20142849. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2849>
- Baldock, K. C. (2020). Opportunities and threats for pollinator conservation in global towns and cities. *Current Opinion in Insect Science*, 38, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.006>

- Barron, M. G., Albro, P. W., & Hayton, W. L. (1995). Biotransformation of di(2-ethylhexyl)phthalate by rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(5), 873-876. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140519>
- Bee-health. (2019, août 20). *Anatomy of the Honey Bee – Bee Health*. <https://bee-health.extension.org/anatomy-of-the-honey-bee/#:~:text=Bees%20also%20have%20an%20open,of%20tracheas%20and%20air%20sacs>.
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., & Moilleron, R. (2013). Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8057-8076. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1982-5>
- Billings, A., Kevin, C., Jones, B., Glória Pereira, M., David, J. & Spurgeon, C. (2021, 30 juillet). Plasticisers in the terrestrial environment : sources, occurrence and fate. *CSIRO PUBLISHING*. Consulté le 5 octobre 2022, à l'adresse <https://www.publish.csiro.au/en/Fulltext/EN21033>
- Bischoff, I., Eckelt, E., & Kuhlmann, M. (2005). On the biology of the ivy-bee *Colletes hederæ* Schmidt & Westrich, 1993 (Hymenoptera, Apidae). *Bonner Zoologische Beiträge*, 53, 27-36.
- Blanchard, M., Garban, B., Ollivon, D., Teil, M. J., Tiphagne, K., & Chevreuril, M. 4.2. 3. Sources, devenir et écotoxicité des Phtalates dans l'environnement. Comparaison avec les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et les Polychlorobiphényles.
- B-Lands Consulting. (s. d.). *EU REACH | Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) | B-Lands Consulting*. (c)2007-2020 reachteam.eu, all rights reserved. https://reachteam.eu/web/english/legislations/EU/reach/regulation-EC-1907-2006_V_dd.mm.yyyy.html
- Blitzer, Eleanor J.; Gibbs, Jason; Park, Mia G.; Danforth, Bryan N. (2016). *Pollination services for apple are dependent on diverse wild bee communities*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 221(), 1–7. doi:10.1016/j.agee.2016.01.004
- Bloch, G., Wheeler, D. E., & Robinson, G. E. (2002). Endocrine Influences on the Organization of Insect Societies. *Elsevier eBooks*, 195-235. <https://doi.org/10.1016/b978-012532104-4/50042-1>
- Brady, S. G., Sipes, S., Pearson, A., & Danforth, B. N. (2006). Recent and simultaneous origins of eusociality in halictid bees. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 273(1594), 1643-1649. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3496>
- Brown D.; Charlotte P. Croudace; Nicola J. Williams; Julian M. Shearing; Peter A. Johnson (1998). *The effect of phthalate ester plasticisers tested as surfactant stabilised dispersions on the reproduction of the Daphnia magna.* , 36(6), 0–1379. doi:10.1016/s0045-6535(97)10018-2
- Cao, H., Wiemerslage, L., Marttila, P. S. K., Williams, M., & Schiöth, H. B. (2016). Bis-(2-ethylhexyl) Phthalate Increases Insulin Expression and Lipid Levels in *Drosophila melanogaster*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(3), 309-316. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12587>
- Cariveau, D. P. & Winfree, R. (2015). Causes of variation in wild bee responses to anthropogenic drivers. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.004>

- Carnevali, O., Tosti, L., Speciale, C., Peng, C., Zhu, Y., & Maradonna, F. (2010). DEHP Impairs Zebrafish Reproduction by Affecting Critical Factors in Oogenesis. *PLOS ONE*, 5(4), e10201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010201>
- CEFIC (2018). Plasticisers fact sheet. Consulté le 29 octobre 2022, à l'adresse https://www.plasticisers.org/wpcontent/uploads/2019/08/Plasticisers_Factsheet_EN_MAY2020.pdf
- Chai C, Cheng H, Ge W, Ma D, Shi Y (2014). Phthalic acid esters in soils from vegetable greenhouses in Shandong Peninsula, East China. *PLoS One* 9, e95701. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0095701
- Chang, J. W., Lee, C. C., Pan, W. H., Chou, W. C., Huang, H. B., Chiang, H. C., & Huang, P. C. (2017). Estimated Daily Intake and Cumulative Risk Assessment of Phthalates in the General Taiwanese after the 2011 DEHP Food Scandal. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep45009>
- Chapman, R.E., Wang, J. & Bourke, A.F.G. (2003) Genetic analysis of spatial foraging patterns and resource sharing in bumble bee pollinators. *Molecular Ecology*, 12, 2801–2808.
- Chen, J. (2005). Assessment of Repellency of Nine Phthalates against Red Imported Fire Ant (Hymenoptera : Formicidae) Workers Using Ant Digging Behavior. *Journal of Entomological Science*, 40(4), 368-377. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-40.4.368>
- Chronic Hazard Advisory Panel, 1985. Report to the U.S. Consumer Product Safety Commission on Di(2-Ethylhexyl)Phtalate
- Crall, J. J., De Bivort, B. L., Dey, B., & Versypt, A. N. F. (2019). Social Buffering of Pesticides in Bumblebees : Agent-Based Modeling of the Effects of Colony Size and Neonicotinoid Exposure on Behavior Within Nests. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00051>
- Cuvillier-Hot, V., Salin, K., Devers, S., Tasiemski, A., Schaffner, P., Boulay, R., Billiard, S. & Lenoir, A. (2014). Impact of ecological doses of the most widespread phthalate on a terrestrial species, the ant *Lasius niger*. *Environmental Research*, 131, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.016>
- Danforth, B. N., Minckley, R. L., Neff, J. M., & Fawcett, F. (2019). *The Solitary Bees : Biology, Evolution, Conservation*.
- Dauvergne, P. Why is the global governance of plastic failing the oceans? *Global Environmental Change*, 51(May), 22–31. (2018)
- Dargnat, C., Blanchard, M., Chevreuil, M., & Teil, M. (2009). Occurrence of phthalate esters in the Seine River estuary (France). *Hydrological Processes*, 23(8), 1192-1201. <https://doi.org/10.1002/hyp.7245>
- Davis, B. J., Maronpot, R. R., & Heindel, J. J. (1994). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol and Ovulation in Cycling Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 128(2), 216-223. <https://doi.org/10.1006/taap.1994.1200>
- Decourtye, A., & Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 85-95. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_8

- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neuroscience*, 7(1), 17-30. <https://doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9>
- Drossart M., Rasmont P., Vanormelingen P., Dufrière M., Folschweiller M., Pauly A., Vereecken N. J., Vray S., Zambra E., D'Haeseleer J. & Michez D. 2019. Belgian Red List of bees. Belgian Science Policy 2018 (BRAIN-be - (Belgian Research Action through Interdisciplinary Networks). Mons: Presse universitaire de l'Université de Mons. 140 p.
- Eisenreich, S. J., Looney, B. P., & Thornton, J. D. (1981). Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem. *Environmental Science & Technology*, 15(1), 30-38. <https://doi.org/10.1021/es00083a002>
- Ellers, J. (1996) Fat and eggs: An alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, 46, 227–235.
- Ema, M., Kurosaka, R., Amano, H., & Ogawa, Y. (1995). Comparative developmental toxicity of n-butyl benzyl phthalate and di-n-butyl phthalate in rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(2). <https://doi.org/10.1007/bf00217620>
- Erin T. D.; Kiner, Jacklyn M.; Kerner, Mackenzie E.; Amsalem, Etya (2020). *Shift in worker physiology and gene expression pattern from reproductive to diapause-like with colony age in the bumble bee <i>Bombus impatiens</i>*. *The Journal of Experimental Biology*, (), jeb.218768–. [doi:10.1242/jeb.218768](https://doi.org/10.1242/jeb.218768)
- European Redlist - Environment - European Commission.* (s. d.). <https://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/species/redlist/bees/status.htm>
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture : A review. *Aquaculture*, 500, 237-242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Feng S, Lu H, Tian P, Xue Y, Lu J, Tang M, Feng W (2020). Analysis of microplastics in a remote region of the Tibetan Plateau: Implications for natural environmental response to human activities. *The Science of the Total Environment* 739, 140087. [doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.140087](https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140087)
- Fisher, R. M., & Pomeroy, N. (1989). Incipient colony manipulation, *Nosema* incidence and colony productivity of the bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 581-589.
- Fowler, A., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2020). Parasite defense mechanisms in bees : behavior, immunity, antimicrobials, and symbionts. *Emerging topics in life sciences*, 4(1), 59-76. <https://doi.org/10.1042/etls20190069>
- Fréry, Nadine *et al.* 2020. “Biomonitoring of Occupational Exposure to Phthalates: A Systematic 787 Review.” *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 229(January): 113548-788 <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113548>.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J. & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36(6), 1429-1438. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00367-0](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00367-0)
- Frye, C. A., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M. A., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Page, Y. L., Patisaul, H. B., Venerosi, A., Wójtowicz, A., & Panzica, G. (2012). *Endocrine Disrupters : A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on*

- Behaviour and Neuroendocrine Systems. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 144-159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x>
- Gäde, G. (2004). REGULATION OF INTERMEDIARY METABOLISM AND WATER BALANCE OF INSECTS BY NEUROPEPTIDES. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 93-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123354>
- 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>
- Gao, D. W., & Wen, Z. D. (2016). Phthalate esters in the environment : A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 541, 986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>
- Gekiere, A. (2021). *FROM POISON TO POTION : Effects of sunflower phenolamides on bumblebee microcolonies and individuals* [Mémoire, Université de Mons]. Atlas Hymenoptera.
- German, S. (2014, 11 décembre). *LES PHTALATES*. SCC Quebec. Consulté le 17 septembre 2022, à l'adresse https://www.scc-quebec.org/wp-content/uploads/2017/08/Les-phtalates_Sandra-2014.pdf
- Geslin, B., Gauzens, B., Thébault, E., & Dajoz, I. (2013d). Plant Pollinator Networks along a Gradient of Urbanisation. *PLOS ONE*, 8(5), e63421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063421>
- Geslin, B., Le Féon, V., Folschweiller, M., Flacher, F., Carmignac, D., Motard, E., Perret, S., & Dajoz, I. (2016). The proportion of impervious surfaces at the landscape scale structures wild bee assemblages in a densely populated region. *Ecology and Evolution*, 6(18), 6599–6615. <https://doi.org/10.1002/ece3.2374>
- Ghisbain, G. (2021). Are Bumblebees Relevant Models for Understanding Wild Bee Decline ? *Frontiers in Conservation Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcosc.2021.752213>
- Giam, C. S., Chan, H. S., Neff, G. S., & Atlas, E. L. (1978). Phthalate Ester Plasticizers : A New Class of Marine Pollutant. *Science*, 199(4327), 419-421. <https://doi.org/10.1126/science.413194>
- Gill, R. D., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108. <https://doi.org/10.1038/nature11585>
- Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenzcek, T. (1997). BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 611-643. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.611>
- Godwin AD, Krauskopf LG. Plasticizers. In: Wilkes C, Summers J, Daniels C, editors. PVC handbook. Cincinnati: Hanser Publications; 2005.
- Gong, M., Zhang, Y., & Weschler, C. J. (2014b). Measurement of Phthalates in Skin Wipes : Estimating Exposure from Dermal Absorption. *Environmental Science & ; Technology*, 48(13), 7428-7435. <https://doi.org/10.1021/es501700u>
- Goodman, W. G., & Cusson, M. (1976b). The Juvenile Hormones. *Elsevier eBooks*, 310-365. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384749-2.10008-1>

- Goulson, D. (2003). Effects of Introduced Bees on Native Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 1-26. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132355>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Gray, L. E. (2000). Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. *Toxicological Sciences*, 58(2), 350-365. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350>
- Gruntenko, N. E., & Rauschenbach, I. Y. (2008). Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 902-908. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.004>
- HADLEY, N. F. (1981). CUTICULAR LIPIDS OF TERRESTRIAL PLANTS AND ARTHROPODS : A COMPARISON OF THEIR STRUCTURE, COMPOSITION, AND WATERPROOFING FUNCTION. *Biological Reviews*, 56(1), 23-47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1981.tb00342.x>
- Hagedorn, H. (1985b). The Role of Ecdysteroids in Reproduction. *Elsevier eBooks*, 205-262. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-030809-8.50013-7>
- Hahladakis, J. N., Velis, C. A., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics : Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179-199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>
- Hapsari, M., Firmansyah, Setyadharma, A. & Fajarini Sri Wahyuningsum, I. (2020). Plastic Industry and World Environmental Problems. *E3S Web of Conferences*, 202, 05020. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202020205020>
- Harris, C A; Henttu, P; Parker, M G; Sumpter, J P (1997). The estrogenic activity of phthalate esters in vitro.. *Environmental Health Perspectives*, 105(8), 802–811. doi:10.1289/ehp.97105802
- Heckel, D. G. (2012). Insecticide Resistance After *Silent Spring*. *Science*, 337(6102), 1612-1614. <https://doi.org/10.1126/science.1226994>
- Hegland, S. J., Nielsen, A., Lázaro, A., Bjercknes, A., & Totland, Ø. (2009). How does climate warming affect plant-pollinator interactions ? *Ecology Letters*, 12(2), 184-195. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01269.x>
- Hennig, E. I., & Ghazoul, J. (2011b). Plant–pollinator interactions within the urban environment. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*, 13(2), 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.03.003>
- Herrero, O., Planelló, R., & Morcillo, G. (2015). The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere*, 128, 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.059>
- Hoshizaki, D. K. (2005). Fat-Cell Development. *Elsevier eBooks*, 315-345. <https://doi.org/10.1016/b0-44-451924-6/00025-9>

- IHS Markit (2021), Chemical Economics Handbook -- Plasticizers, <https://www.ihs.com/products/plasticizers-chemical-economics-handbook.html> (consulté le 22 avril 2023)
- Ings, T. C., Schikora, J., & Chittka, L. (2005). Bumblebees, humble pollinators or assiduous invaders ? A population comparison of foraging performance in *Bombus terrestris*. *Oecologia*, *144*(3), 508-516. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0081-9>
- IPBES (2019): Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3831673>
- Jarnstrom, H., Vares, S. & Airaksinen, M. Semi volatile organic compounds and flame retardants. Occurrence in indoor environments and risk assessment for indoor exposure. *VTT Tiedotteita-Research notes* **2486**, 1–58 <http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2009/T2486.pdf>. (accessed 16.11.04) (2009).
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrury, A, Narayan, R., Law, K.L., Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, (September 2014), 1655–1734. (2014)
- Jégou, B. (1996, juin). Les hommes deviennent-ils moins fertiles ? *larecherche.fr*. <https://www.larecherche.fr/les-hommes-deviennent-ils-moins-fertiles>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(7), 2897-2908. <https://doi.org/10.1021/jf101303g>
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R. D., Parker, M., & Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*, *103*(6), 582-587. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103582>
- Johnson, L. K. & Hubbell, S. P. 1974 Aggression and competition among stingless bees: field studies. *Ecology* *55*, 120–127.
- Johnson, R. F., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, *41*(3), 312-331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Jones, E. L., & Leather, S. R. (2012). Invertebrates in urban areas: A review. *European Journal of Entomology*, *109*(4), 463–478. <https://doi.org/10.14411/eje.2012.060>
- Kavlock, R. J., Boekelheide, K., Chapin, R. E., Cunningham, M. J., Faustman, E. M., Foster, P., Golub, M. S., Henderson, R. F., Hinberg, I., Little, R. E., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R. W., Williams, P. L., & Zacharewski, T. R. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction : phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reproductive Toxicology*, *16*(5), 529-653. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(02\)00032-1](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(02)00032-1)
- Kennedy, C. M., Oakleaf, J. R., Theobald, D. M., Baruch-Mordo, S., and Kiesecker, J. (2019). Managing the middle: A shift in conservation priorities based on the global human modification gradient. *Glob. Change Biol.* *25*, 811–826. doi: 10.1111/gcb.14549

- Kerr, W. E., Ferreira, A. & Simões de Mattos, N. 1963 Communication among stingless bees: additional data (Hymenoptera: Apidae). *J. N. Y. Entomol. Soc.* 71, 80–90.
- Kerr, J. T., Pindar, A., Galpern, P., Packer, L., Potts, S. G., Roberts, S. M., Rasmont, P., Schweiger, O., Colla, S. R., Richardson, L. L., Wagner, D. L., Gall, L. F., Sikes, D. S., & Pantoja, A. (2015). Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, 349(6244), 177-180. <https://doi.org/10.1126/science.aaa7031>
- Kevan, P. G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment : species, activity and diversity. Dans *Elsevier eBooks* (p. 373-393). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-50019-9.50021-2>
- Kilby, B. (1963). The Biochemistry of the Insect Fat Body. *Advances in Insect Physiology*, 111-174. [https://doi.org/10.1016/s0065-2806\(08\)60175-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2806(08)60175-7)
- Kim, E. J., Kim, J. W., & Lee, S. K. (2002). Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environment International*, 28(5), 359-365. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00058-2](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00058-2)
- Kim, J., Lee, S., Kwak, K., Chung, W. J., & Choi, K. (2011). Etermination of mRNA expression of DMRT93B, vitellogenin, and cuticle 12 in *Daphnia magna* and their biomarker potential for endocrine disruption. *SpringerLink*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-011-0707-0>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Krieger, G. M., Duchateau, M. J., Van Doorn, A., Ibarra, F. R., Francke, W., & Ayasse, M. (2006). Identification of Queen Sex Pheromone Components of the Bumblebee *Bombus terrestris*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2), 453-471. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9013-8>
- Kuzukiran, O., Yurdakok-Dikmen, B., Erkmén, B., Gunal, A., Arslan, P., Pacal, E., Totan, F. E., Filazi, A., Yildirim, Z., & Erkoç, F. (2022b). Sublethal responses of the indicator *Unio* species (mussel) to selected phthalate esters. *Biologia*, 77(3), 851-864. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00985-6>
- Knowles C.O ; Michael J. McKee; Donald U. Palawski (1987). *Chronic effects of DI-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of Daphnia magna* , 6(3), 201–208. doi:10.1002/etc.5620060305
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., & Rousselle, C. (2015). Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors : a qualitative method of assessment. *Environmental Health*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1476-069x-14-13>
- Larsson, P., & Thurén, A. (1987). DI-2-ethylhexylphthalate inhibits the hatching of frog eggs and is bioaccumulated by tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6(6), 417-422. <https://doi.org/10.1002/etc.5620060602>
- Law, J. K., & Wells, M. A. (1989). Insects as biochemical models. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16335-16338. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)84707-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)84707-5)
- Lee, S. K., Owens, G. A., & Veeramachaneni, D. N. R. (2005). Exposure to Low Concentrations of Di-n-butyl Phthalate During Embryogenesis Reduces Survivability and Impairs Development of

- Xenopus Laevis Frogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(10), 763-772. <https://doi.org/10.1080/15287390590930243>
- Lehneer and Duvoisin (2003). *Biologie de l'abeille* (Volume 2). Edition VDRB, Winikon, Suisse.
- Lenoir, A., Cuvillier-Hot, V., Devers, S., Christidès, J. P., & Montigny, F. (2012b). Ant cuticles : A trap for atmospheric phthalate contaminants. *Science of The Total Environment*, 441, 209-212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.003>
- Lenoir, A., Boulay, R., Dejean, A. *et al.* Phthalate pollution in an Amazonian rainforest. *Environ Sci Pollut Res* 23, 16865–16872 (2016). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7141-z>
- Li, J., Li, H., Lin, D., Li, M., Wang, Q., Song, X., Zhang, Y., & Liu, F. (2021). Effects of butyl benzyl phthalate exposure on *Daphnia magna* growth, reproduction, embryonic development and transcriptomic responses. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124030. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124030>
- Ligocki Mary P.; Christian Leuenberger; James F. Pankow (1967). *Trace organic compounds in rain— III. Particle scavenging of neutral organic compounds.*, 19(10), 1619–1626. doi:10.1016/0004-6981(85)90214-8
- Lindauer, M. (1976). The social behavior of the bees : a comparative study. *Insectes Sociaux*, 23(2), 199-200. <https://doi.org/10.1007/bf02223852>
- Lockey, K. H. (1988). Lipids of the insect cuticle : origin, composition and function. *Comparative biochemistry and physiology. B. Comparative biochemistry*, 89(4), 595-645. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(88\)90305-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90305-7)
- Lu, Y., Lin, M., & Aitken, R. G. (2017). Exposure of spermatozoa to dibutyl phthalate induces abnormal embryonic development in a marine invertebrate *Galeolaria caespitosa* (Polychaeta : Serpulidae). *Aquatic Toxicology*, 191, 189-200. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.008>
- Lyu, L., Tao, Y., Ju, H. & Chen, J. (2022). Health risks of phthalates, *Environmental Pollution*, 313, 120173. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120173>
- Makepeace, David K.; Smith, Daniel W.; Stanley, Stephen J. (1995). *Urban stormwater quality: Summary of contaminant data. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25(2), 93–139. doi:10.1080/10643389509388476
- Mathiasson, M. E. & Rehan, S. M. (2020). Wild bee declines linked to plant-pollinator network changes and plant species introductions. *Insect Conservation and Diversity*, 13(6), 595-605. <https://doi.org/10.1111/icad.12429>
- Matias, D. M. S., Leventon, J., Rau, A.-L., Borgemeister, C., and von Wehrden, H. (2017). A review of ecosystem service benefits from wild bees across social contexts. *Ambio* 46, 456–467. doi: 10.1007/s13280-016-0844-z
- McKinney, M. L. (2006b). Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation*, 127(3), 247-260. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.005>
- Meeus, I., Pisman, M., Smaghe, G., & Piot, N. (2018). Interaction effects of different drivers of wild bee decline and their influence on host–pathogen dynamics. *Current opinion in insect science*, 26, 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.007>

- Michael, P., Adams, W. M., Werner, A. F., & Hicks, O. (1984). Surveillance of phthalate esters in surface waters and sediments in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.5620030303>
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press.
- Michener, C. D. (2007). *The bees of the world* (2nd ed). Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Michez, D., Vanderplanck, M. & Engel, M. S. (2011). Fossil bees and their plant associates. *Evolution of Plant-Pollinator Relationships*, 103-164. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139014113.006>
- Michez, D., Rasmont, P., & Terzo, M. (2019). *Abeilles d'Europe : Hyménoptères d'Europe • 1 (French Edition)*. NAP.
- Moore, N. P. (2000). The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reproductive Toxicology*, 14(3), 183-192. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(00\)00068-x](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(00)00068-x)
- Moreau-Guigon, E., Alliot, F., Gasperi, J., Blanchard, M., Teil, M., Mandin, C., & Chevreuil, M. (2016). Seasonal fate and gas/particle partitioning of semi-volatile organic compounds in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*, 147, 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.10.006>
- Moreira, M. A., André, L. C., & Cardeal, Z. D. L. (2015c). Analysis of plasticiser migration to meat roasted in plastic bags by SPME–GC/MS. *Food Chemistry*, 178, 195-200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.078>
- Mukunda, L., Miazzi, F., Kaltofen, S., Hansson, B. S., & Wicher, D. (2014). Calmodulin modulates insect odorant receptor function. *Cell Calcium*, 55(4), 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.013>
- Müller, A. K., Nielsen, E., & Ladefoged, O. (2003). *Human exposure to selected phthalates in Denmark*. (1. ed.) The Danish Veterinary and Food Administration.
- Murature, D. (1987). *Phthalate esters and semen quality parameters*. / NCBI. Consulté le 1 novembre 2022, à l'adresse <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2957007/>
- Net, S., Rabodonirina, S., Sghaier, R. B., Dumoulin, D., Chbib, C., Tlili, I., & Ouddane, B. (2015). Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Science of The Total Environment*, 521-522, 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.087>
- Nieto, A., Kemp, J., Roberts, S. P. M., & Rasmont, P. (2014). *European Red List of Bees*. International Union for Conservation of Nature. <https://doi.org/10.2779/77003>
- OCDE, Holland, M. (Éd.). (2018). *Socio-economic assessment of phthalates*. [https://one.oecd.org/document/ENV/WKP\(2018\)7/En/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/WKP(2018)7/En/pdf)
- Ogner, G., & Schnitzer, M. (1970). Humic Substances : Fulvic Acid-Dialkyl Phthalate Complexes and Their Role in Pollution. *Science*, 170(3955), 317-318. <https://doi.org/10.1126/science.170.3955.317>
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011b). How many flowering plants are pollinated by animals ? *Oikos*, 120(3), 321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>

- Osborne J.L. ; Andrew P. Martin; Chris R. Shortall; Alan D. Todd; Dave Goulson; Mairi E. Knight; Roddy J. Hale; Roy A. Sanderson (2008). *Quantifying and comparing bumblebee nest densities in gardens and countryside habitats.* , 45(3), 784–792. doi:10.1111/j.1365-2664.2007.01359.x
- Owen, E., Bale, J. S., & Hayward, S. A. L. (2013). Can Winter-Active Bumblebees Survive the Cold ? Assessing the Cold Tolerance of *Bombus terrestris* audax and the Effects of Pollen Feeding. *PLOS ONE*, 8(11), e80061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080061>
- Paluselli, A., Fauvelle, V., Galgani, F., & Sempéré, R. (2018). Phthalate Release from Plastic Fragments and Degradation in Seawater. *Environmental Science & ; Technology*, 53(1), 166-175. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05083>
- Pandey, A. K., Sharma, V., & Ram, K. R. (2022). Drosophila ecdysone receptor activity-based ex vivo assay to assess the endocrine disruption potential of environmental chemicals. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(37), 56430-56441. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19789-5>
- Pang, X., Skillen, N., Gunaratne, N., Rooney, D. W., & Robertson, P. K. (2021). Removal of phthalates from aqueous solution by semiconductor photocatalysis : A review. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123461. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123461>
- PASTEELS, J. J. & J. M. PASTEELS. 1972. Les soies cuticulaires des Megachilidae (Hymenoptera, Apoidea) vues au microscope electronique a balayage. Mem. Acad. Roy. Sci. Belgique, Cl. Sci. (4), sér. 2, 18: 1-
- Phtalates Information Centre. <http://www.phthalates.com/>
- Planelló, R., Herrero, O., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2011). Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquatic Toxicology*, 105(1-2), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.011>
- Pomeroy, N., & Plowright, R. C. (1979). *Larval ejection following CO2 narcosis of bumble bees (Hymenoptera : Apidae)*. https://www.researchgate.net/publication/285484161_Larval_ejection_following_CO2_narcosis_of_bumble_bees_Hymenoptera_Apidae
- Porto, R. G., de Almeida, R. F., Cruz-Neto, O., Tabarelli, M., Viana, B. F., Peres, C. A., et al. (2020). Pollination ecosystem services: a comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. *Food Sec.* 12, 1425–1442. doi: 10.1007/s12571-020-01043-w
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P. J., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines : trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Pradhan, A., Olsson, P., & Jass, J. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 190, 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.123>
- Rahman, M., & Brazel, C. S. (2004). The plasticizer market : an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*, 29(12), 1223-1248. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.10.001>

- Raimets, R., Karise, R., Mänd, M., Kaart, T., Ponting, S., Song, J., & Cresswell, J. E. (2018b). Synergistic interactions between a variety of insecticides and an ergosterol biosynthesis inhibitor fungicide in dietary exposures of bumble bees (*Bombus terrestris* L.). *Pest Management Science*, 74(3), 541-546. <https://doi.org/10.1002/ps.4756>
- Rasmont, P., Franzén, M., Lecocq, T., Harpke, A., Roberts, S. K., Biesmeijer, J. C., Castro, L., Cederberg, B., Dvorak, L., Fitzpatrick, Ú., Gonseth, Y., Haubruge, E., Mahé, G., Manino, A., Michez, D., Neumayer, J., Ødegaard, F., Paukkunen, J., Pawlikowski, T., . . . Schweiger, O. (2015). Climatic Risk and Distribution Atlas of European Bumblebees. *BioRisk*, 10, 1-236. <https://doi.org/10.3897/biorisk.10.4749>
- Rasmont, P., Martinet, B., Franzén, M., Harpke, A., Kerr, J., Lecocq, T., Michez, D., Potts, S.G., Roberts, S.P., & Schweiger, O. (2016). How does climate change affect bumblebee diversity.
- Rasmont, P., Ghisbain, G., Terzo, M., & Goulson, D. (2021). *Bourdons d'Europe : et des contrées voisines*. NAP éditions.
- Regali, A. & Rasmont, P. (1995) Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez des colonies orphelines de *Bombus terrestris* (L) (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 26, 273–281.
- Richburg, J. H., & Boekelheide, K. (1996). Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Rapidly Alters both Sertoli Cell Vimentin Filaments and Germ Cell Apoptosis in Young Rat Testes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137(1), 42-50. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0055>
- Riddiford, L. M. (1994). Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone I. General Considerations and Premetamorphic Actions. *Elsevier eBooks*, 213-274. [https://doi.org/10.1016/s0065-2806\(08\)60084-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2806(08)60084-3)
- ROBERTS, R. B. & S. R. VALLESPIR. 1978. Specialization of hairs bearing pollen and oil on the legs of bees (Apoidea: Hymenoptera) *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 71: 619-627
- Rosales, C. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. *Insect Physiology and Ecology*. <https://doi.org/10.5772/67107>
- Röseler, Peter-Frank (1970). Unterschiede in der Kastendetermination zwischen den Hummelarten *Bombus hypnorum* und *Bombus terrestris* / Differences in the Caste Determination between the Bumblebee Species *Bombus hypnorum* and *Bombus terrestris*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 25(5), -. doi:10.1515/znb-1970-0521
- Saillenfait, A. M. & Laudet-Hesbert, A. (2005). Phtalates. *EMC - Toxicologie-Pathologie*, 2(1), 1-13. Consulté le 1 novembre 2022. <https://doi.org/10.1016/j.emctp.2004.10.003>
- Salapavidou, M., Samara, C., & Voutsas, D. (2011). Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, 45(22), 3720-3729. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.04.025>
- Sandoz, J. (2011). Behavioral and Neurophysiological Study of Olfactory Perception and Learning in Honeybees. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00098>
- SCHETTLER, T. (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*, 29(1), 134-139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00567.x>

- Schmidt, J. S., Schaedlich, K., Fiandanese, N., Pocar, P., & Fischer, B. (2012). Effects of Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) on Female Fertility and Adipogenesis in C3H/N Mice. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1123-1129. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104016>
- Schooley, D. A., Horodyski, F. M., & Coast, G. M. (2012). Hormones Controlling Homeostasis in Insects. *Elsevier eBooks*, 366-429. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384749-2.10009-3>
- Seyoum, A., & Pradhan, A. (2019). Effect of phthalates on development, reproduction, fat metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 654, 969-977. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.158>
- Sgolastra, Fabio; Hinarejos, Silvia; Pitts-Singer, Theresa L; Boyle, Natalie K; Joseph, Timothy; Lückmann, Johannes; Raine, Nigel E; Singh, Rajwinder; Williams, Neal M; Bosch, Jordi (2018). *Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Solitary Bees*. *Environmental Entomology*, (), -. doi:10.1093/ee/nvy105
- Sıralı, R., Ugur, A., & Kocamanaoğlu, C. (2012). The possibilities of using bumble bees in greenhouses. *Aricılık Araştırma Dergisi* 4 (7), 16-20.
- Skorupski, P., & Chittka, L. (2010). Differences in Photoreceptor Processing Speed for Chromatic and Achromatic Vision in the Bumblebee, *Bombus terrestris*. *The Journal of Neuroscience*, 30(11), 3896-3903. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5700-09.2010>
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2004). The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany*, 91(10), 1614-1626.
- Stanley, D. (2006). PROSTAGLANDINS AND OTHER EICOSANOIDS IN INSECTS : Biological Significance. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 25-44. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151021>
- Storey, K. B. (1997). Organic Solutes in Freezing Tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Physiology*, 117(3), 319-326. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(96\)00270-8](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(96)00270-8)
- Straub, L., Williams, G. C., Pettis, J., Fries, I., & Neumann, P. J. (2015). Superorganism resilience : eusociality and susceptibility of ecosystem service providing insects to stressors. *Current opinion in insect science*, 12, 109-112. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.10.010>
- Sultan, C., Balaguer, P., Térouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lumbroso, S., & Nicolas, J. (2001). Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178(1-2), 99-105. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00430-0](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00430-0)
- Staples A. Charles; William J. Adams; Thomas F. Parkerton; Joseph W. Gorsuch; Gregory R. Biddinger; Kevin H. Reinert (1997). Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. , 16(5), 875–891. doi:10.1002/etc.5620160507
- Svingen, T., & Vinggaard, A. M. (2016). The risk of chemical cocktail effects and how to deal with the issue. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 70(4), 322-323. <https://doi.org/10.1136/jech-2015-206268>
- Teil M.J.; Blanchard M.; Chevreuil M. (2006). *Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France)*. , 354(2-3), 212–223. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.083
- Theodorou, P., Radzevičiūtė, R., Settele, J., Schweiger, O., Murray, T. E., & Paxton, R. J. (2016). Pollination services enhanced with urbanization despite increasing pollinator parasitism.

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283(1833), 20160561. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0561>
- Theodorou, P., Baltz, L. M., Paxton, R. J., & Soro, A. (2021). Urbanization is associated with shifts in bumblebee body size, with cascading effects on pollination. *Evolutionary Applications*, 14(1), 53-68. <https://doi.org/10.1111/eva.13087>
- Tian, C. (2016, 9 février). *Bio-Source of di-n-butyl phthalate production by filamentous fungi*. Nature. https://www.nature.com/articles/srep19791?error=cookies_not_supported&code=fac7e2a5-a49e-45b7-b4ac-70ec6f45c20b
- Toropov, A. A., Svendsen, C., Lasagni, S., Grech, A., Quignot, N., Amzal, B., Toma, C., De Graaf, D. C., Rortais, A., Cortinas-Abrahantes, J., Capri, E., Kramer, N. I., Benfenati, E., Spurgeon, D., Guillot, G., & Dorne, J. (2019). Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees : Meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. *Environment International*, 133, 105256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105256>
- Trasande, L., Liu, B. & Bao, W. (2022, 1 janvier). Phthalates and attributable mortality : A population-based longitudinal cohort study and cost analysis. *ScienceDirect*. Consulté le 5 octobre 2022, à l'adresse <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121016031>
- Tufail, M., & Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1447-1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>
- UNEP, State Plastics World Environment Day Outlook, (2018), consulté le 30 octobre 2022, à l'adresse <https://www.unenvironment.org/resources/report/state-plastics-world-environmentday-outlook-2018>
- Uren-Webster, T. M., Lewis, C., Filby, A. L., Paull, G. C., & Santos, E. M. (2010). Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.015>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathélet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees ? *PLOS ONE*, 9(1), e86209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086209>
- Velthuis H. H. W. 2002. The historical background of the domestication of the bumble-bee, *Bombus terrestris*, and its introduction in agriculture, p. 177-184 in: Kevan P, Imperatriz Fonseca V. L. (eds.) *Pollinating Bees - The conservation link between agriculture and nature*. Ministry of Environment, Sao Paulo, Brasil.
- Verrier, P. (1992). *Plastifiants*. Ed. Techniques Ingénieur.

- Wang, P., Wang, S., & Fan, C. (2008). Atmospheric distribution of particulate- and gas-phase phthalic esters (PAEs) in a Metropolitan City, Nanjing, East China. *Chemosphere*, 72(10), 1567-1572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.032>
- Ward J, Peters J, Perella C, Gonzalez F. Receptor and non-receptor mediated organ-specific toxicity of di(2- ethylhexyl) phthalate (DEHP) in peroxisome proliferatoractivated receptor alpha-null mice. *Toxicol Pathol* (1998). Consulté le 2 novembre 2022, à l'adresse <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9547862/>
- Wei, W., Bonvallet, N., Gustafsson, S., Raffy, G., Glorennec, P., Krais, A., Ramalho, O., Le Bot, B., & Mandin, C. (2018). Bioaccessibility and bioavailability of environmental semi-volatile organic compounds via inhalation : A review of methods and models. *Environment International*, 113, 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.024>
- Weill, M., Malcolm, C. A., Chandre, F., Mogensen, K. E., Berthomieu, A., Marquine, M., & Raymond, M. (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology*, 13(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x>
- Weschler, C. J., Salthammer, T., & Fromme, H. (2008). Partitioning of phthalates among the gas phase, airborne particles and settled dust in indoor environments. *Atmospheric Environment*, 42(7), 1449-1460. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.11.014>
- Williams, I. H. 1994. The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees. *Agricultural Science Reviews*. 6, pp. 229-257.
- Wilson, J. N., Forister, M. L., & Carril, O. M. (2017). Interest exceeds understanding in public support of bee conservation. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(8), 460-466. <https://doi.org/10.1002/fee.1531>
- Winston, M. L. (1987). *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press.
- Wu-Smart, J., & Spivak, M. (2016). Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep32108>
- Wyatt, G., & Davey, K. (1996). Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in Adult Insects. *Elsevier eBooks*, 1-155. [https://doi.org/10.1016/s0065-2806\(08\)60030-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2806(08)60030-2)
- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Caba, A., & Ruck, W. (2005). Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmospheric Environment*, 39(18), 3209-3219. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.021>
- Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A., & Ruck, W. (2006). Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, 565(2), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.027>
- Xu, Y., Liu, X., Zhao, J., Huang, H., Wu, M., Li, X., Li, W., Sun, X., & Sun, B. (2021). An efficient phthalate ester-degrading *Bacillus subtilis* : Degradation kinetics, metabolic pathway, and catalytic mechanism of the key enzyme. *Environmental Pollution*, 273, 116461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116461>

- Xu, Q., Yin, X., Wang, M., Wang, H., Zhang, N., Shen, Y., Xu, S., Zhang, L., & Gu, Z. (2010). Analysis of Phthalate Migration from Plastic Containers to Packaged Cooking Oil and Mineral Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11311-11317. <https://doi.org/10.1021/jf102821h>
- Xu, H. E., Cao, W., Sun, H., Zhang, S., Li, P., Jiang, S., & Zhong, C. (2021). Dose-Dependent Effects of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.658361>
- Yue, M., Xu, J., & Hou, W. (2015). Determination of five phthalate esters in running water and milk by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1134/s1061934815090099>
- Zhang, X., Ma, Y., Xi, L., Zhu, G., Li, X., Shi, D., & Fan, J. (2019). Highly efficient photocatalytic removal of multiple refractory organic pollutants by BiVO₄/CH₃COO(BiO) heterostructured nanocomposite. *Science of The Total Environment*, 647, 245-254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.450>
- Zhang, Sh., Guo, Aj., Fan, Tt. *et al.* Phthalates in residential and agricultural soils from an electronic waste-polluted region in South China: distribution, compositional profile and sources. *Environ Sci Pollut Res* 26, 12227–12236 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04669-2>
- Zou, E., & Fingerman, M. (1999). Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 122(1), 115-120. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(98\)10093-2](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(98)10093-2)

ANNEXES

7.1 Expérience préliminaire

7.1.1 Cadre de l'expérience

Dans le cadre de ce mémoire, les abeilles sont exposées topiquement aux phtalates régulièrement. Afin de déterminer quelle fréquence d'exposition est la plus optimale pour ne pas compromettre l'expérience ou induire trop de mortalité, cette expérience préliminaire est réalisée dans le but de déterminer la fréquence optimale d'exposition des abeilles.

Les différents objectifs de cette expérience sont ;

- d'acquérir de l'expérience sur l'entretien des microcolonies,
- de déterminer la fréquence d'endormissement la plus optimale,
- d'établir une technique d'endormissement au froid à la fois rapide et la moins stressante possible pour les ouvrières.

7.1.2 Matériel et méthodes

7.1.2.1 Installation des microcolonies

Avant d'étudier l'effet des phtalates sur le développement des microcolonies de *Bombus terrestris*, il a été nécessaire de réaliser une première manipulation afin de déterminer à quelle fréquence exposer topiquement les ouvrières.

L'installation des 40 microcolonies sont composées chacune de 10 ouvrières sélectionnées aléatoirement au sein de 2 colonies mères fondatrices issues de Biobest. Les microcolonies sont placée dans une salle d'élevage chauffée à $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, avec un taux d'humidité de $60\% \pm 5\%$.

Les cages sont les mêmes qu'utilisées lors de l'expérience principale de ce mémoire.

Tableau 1 : Labélisation des microcolonies selon leur fréquence d'endormissement au froid par semaine

Fréquence d'endormissement au froid	Abréviations	ID des micro-colonies
Contrôle (0 jour par semaine)	C	PME1C01 à PME2C05
Premier jour (un jour par semaine)	P	PME1P01 à PME2P05
Un jour par semaine (pas le premier jour)	U	PME1U01 à PME2U05
Deux jours par semaine	D	PME1D01 à PME2D05

- Les colonies P sont exposées le tout premier jour de leur installation. Cela permet de déterminer si exposer les ouvrières au froid le premier jour impacte le développement des microcolonies (le lundi).
- Les colonies C sont les colonies contrôles, elles ne sont donc pas exposées au froid.
- Les colonies U sont exposées une fois par semaine, 2 jours après l'installation (le mercredi).
- Les colonies D sont exposées deux fois par semaine, en commençant deux jours après l'installation (le mercredi et le vendredi).



Figure 1 : Salle d'élevage. Les microcolonies sont placées sur des étagères et triées par traitement. La salle est maintenue à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, avec un taux d'humidité de $61\% \pm 5\%$. Photographie : C. Terzo.

7.1.1.2 Nourrissage

Le sirop leur est fourni à volonté par un mélange 50/50 d'eau de Spa et de sucre fin cristallisé arrivant aux colonies par capillarité. Le pollen fourni est du pollen de saule mélangé au sirop avec un ratio de 0,15 à 0,3 g de sirop par gramme de pollen. Elles sont nourries tous les deux jours par des candis de $1\text{g} \pm 0,1\text{g}$. Après deux jours, le pollen est récupéré et pesé, et un nouveau candi est fourni aux ouvrières.

7.1.1.3 Exposition au froid

L'exposition au froid se réalise en mettant tous les bourdons d'une colonie dans un pot à confiture et placé au congélateur à -20°C entre 10 et 15 minutes. Une fois tous endormis, les bourdons sont placés sur le ventre dans une boîte de pétri pour simuler l'exposition topique aux phtalates. Ils sont ensuite replacés dans leur pot jusqu'au réveil des tous les bourdons avant de les remettre en salle d'élevage (Fig. 2).



Figure 2 : Simulation d'exposition aux phtalates. Les bourdons sont endormis en groupe de 10, entre 10 et 15 minutes au à -20°C pour la simulation d'exposition topique. Photographie : C. Terzo.

7.1.3 Résultats et discussion générale

Tableau 2 : Nombre total de mortes par fréquence d'exposition

Fréquence d'exposition	C	P	U	D
Nombre total de mortes	2	18	7	8

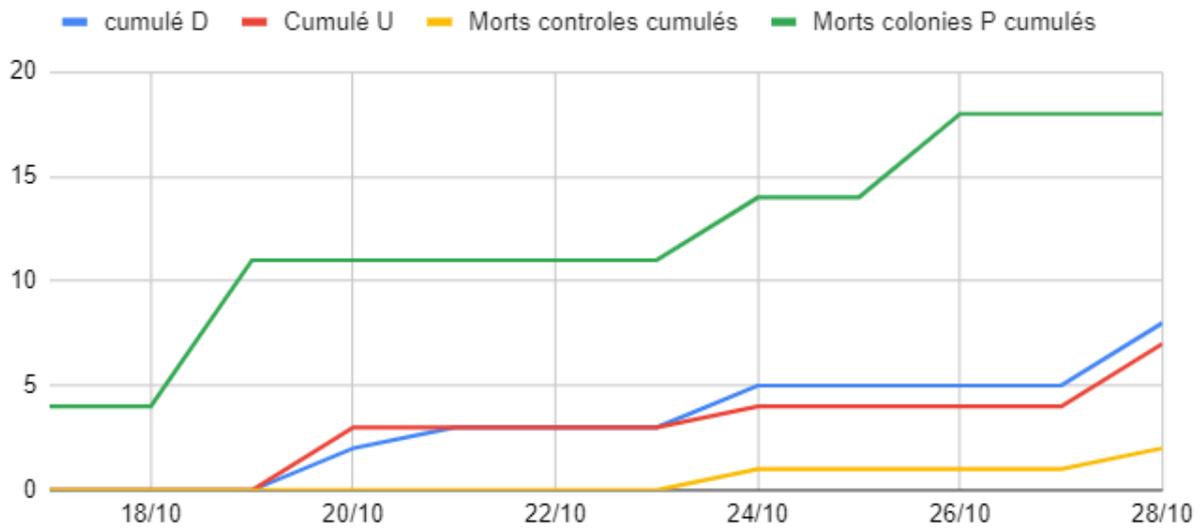


Figure 3 : Nombre de mortes cumulé par fréquence d'exposition.

Les résultats indiquent que les ouvrières qui ont été exposées lors du premiers jour d'installation ont subi plus de mortalité que les autres traitements (Tab. 2, Fig. 3). Il est possible que l'installation suivie de la simulation d'exposition a induit un stress important en plus de perturber les abeilles lors de la mise en place sociale de la microcolonie. Les colonies exposées deux fois par semaine au froid ont une morte de plus que les colonies exposées une seule fois par semaine.

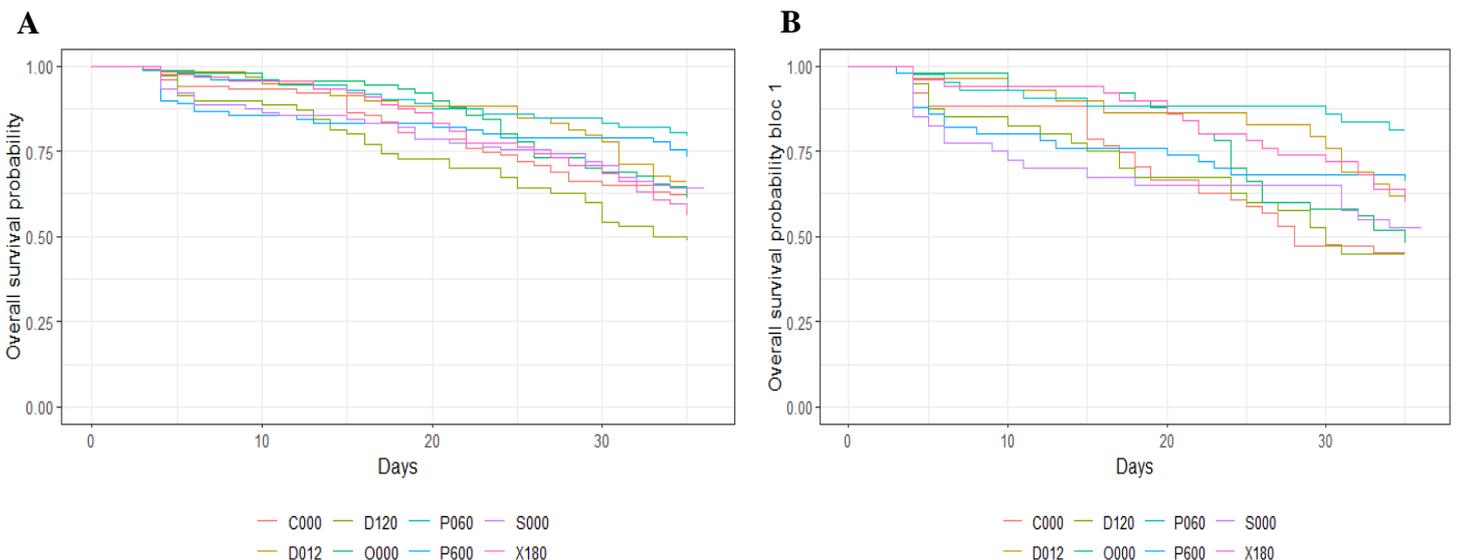
A la fin de cette expérience, nous avons décidé d'exposer les ouvrières une seule fois par semaine, et ce 4 jours après l'installation pour éviter du stress supplémentaire.

Concernant la technique d'anesthésie au froid, nous avons décidé de rester sur protocole d'endormissement expliqué au matériel et méthode.

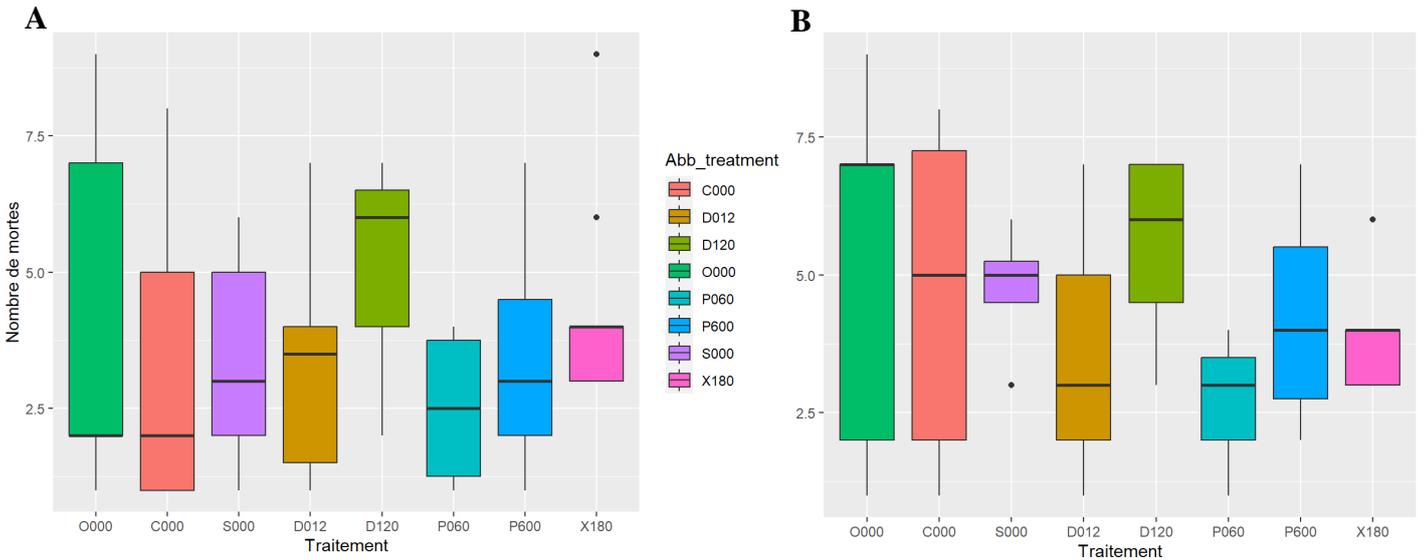
7.3 Compléments de résultats

7.3.1 Mortalité

Il y a eu beaucoup plus de mortes dans le bloc 1 suite à une erreur de manipulation où l'endormissement au froid de la première exposition a été une trop forte source de stress pour les ouvrières, engendrant une forte mortalité le lendemain. L'analyse globale sur la mortalité des ouvrières indique alors une significativité entre les deux blocs (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 197,16$, $df = 1$, $p < 0,001$) et entre les traitements. Le traitement DnBP 60 ng/g est significatif (Régression Cox, $p = 0,0163$) et une tendance pour DEHP 120 ng/g (Régression Cox, $p = 0,0827$) est observée. Les analyses sur le bloc 1 indiquent que DnBP 60 ng/g a un effet significatif sur la mortalité (Régression Cox, $p = 0,000678$), et il y a des tendances pour le traitement cocktail (Régression Cox, $p = 0,09626$), le traitement DnBP 600 ng/g (Régression Cox, $p = 0,057728$) et le traitement DEHP 120 ng/g (Régression Cox, $p = 0,096258$).



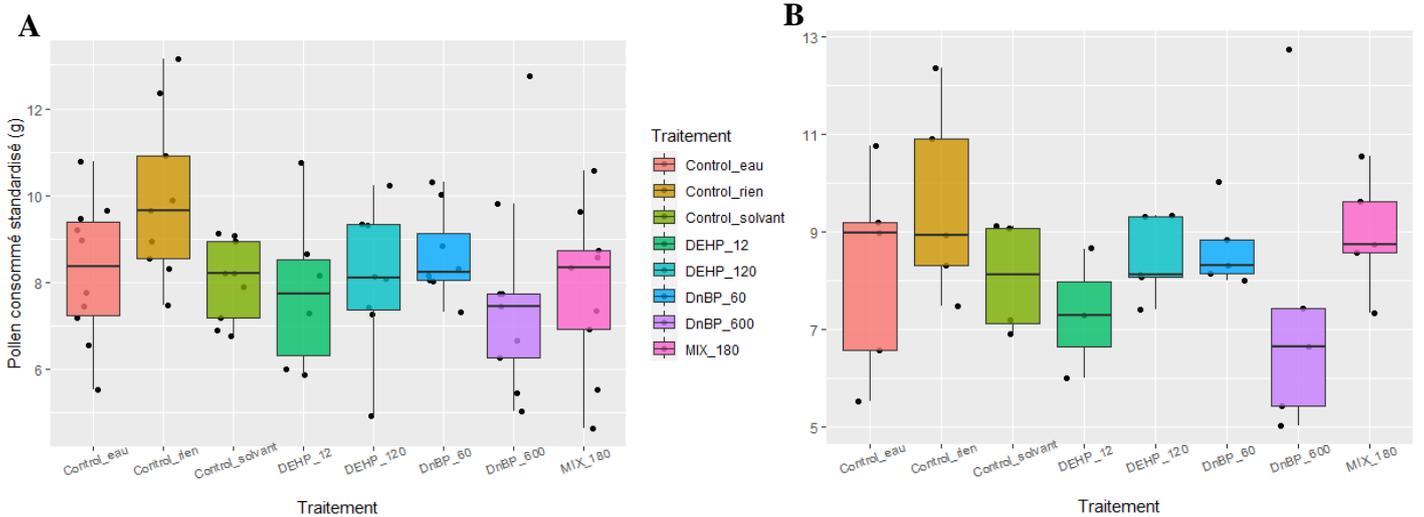
Annexe 1 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières. Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. **A.** Probabilité de survie global des ouvrières en fonction du traitements. **B.** Probabilité de survie global des ouvrières en fonction du traitements.



Annexe 2 : Nombre de mortes en fonction des traitements. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain. Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. **A.** Nombre de mortes global en fonction du traitement. **B** Nombre de mortes du bloc 1 en fonction du traitement.

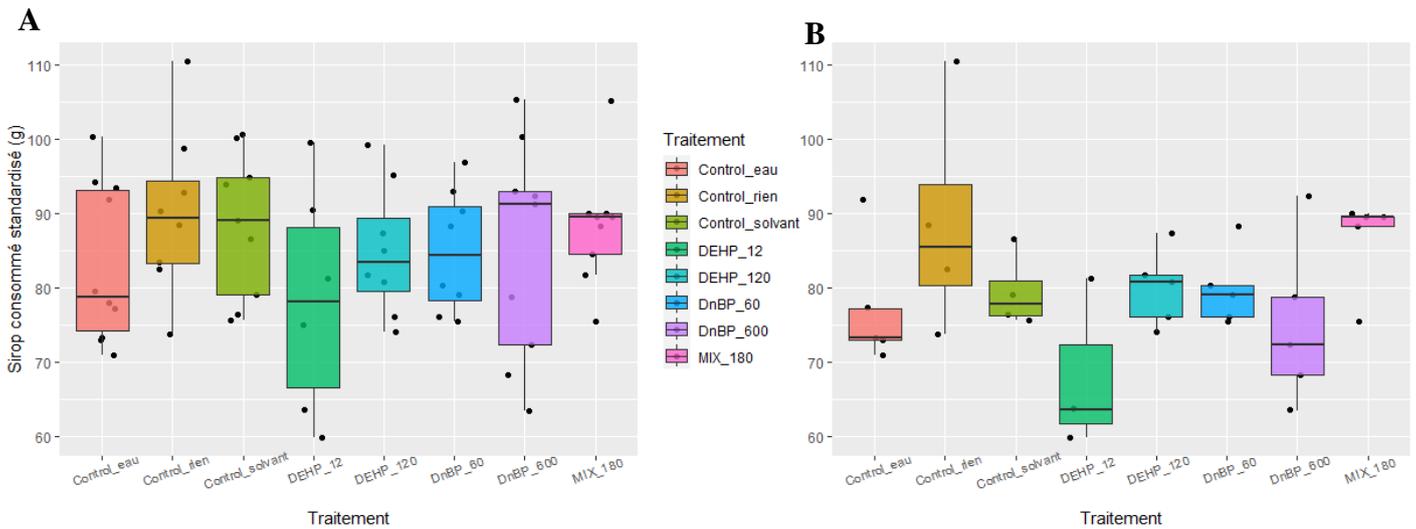
7.3.2 Consommation des ressources et production du couvain

Consommation des ressources : L'analyse globale de consommation de pollen n'a révélé aucune différence significative entre les différents traitements (Annexe 3.A., GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 7,199$, df = 7, p = 0,4085), ainsi que pour l'analyse du bloc 1 (Annexe 3.B., GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 7,897$, df = 7, p = 0,3418).



Annexe 3 : Consommation globale de pollen. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du

couvain. **A.** Consommation de pollen global en fonction des traitements. **B.** Consommation de pollen du bloc 1 en fonction des traitements.



Annexe 4 : Consommation de sirop en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain. **A.** Consommation globale de sirop. **B.** Consommation de sirop du bloc 1.

Production du couvain : Chaque traitement contient les différents stades de développement comprenant les œufs, les larves non-isolées, les larves isolées pré-défécation, les larves isolées post-défécation, les pupes, les mâles non-émergés et les mâles émergés.

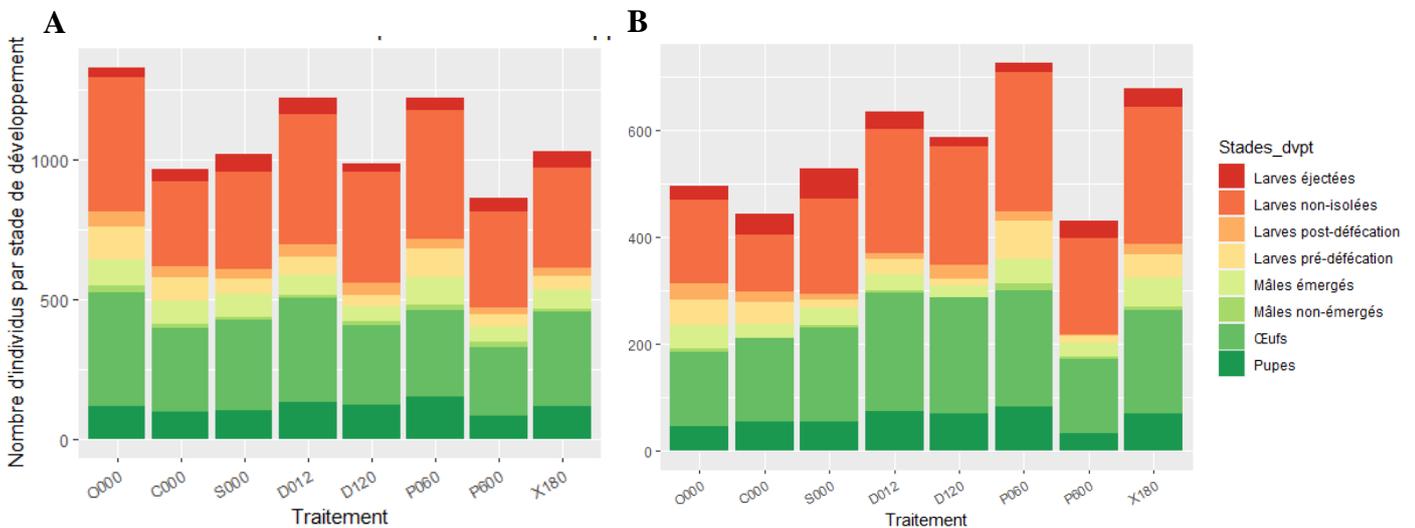
En analysant globalement le nombre et la masse des différents stades de développement, le nombre d'œufs ne varie pas significativement selon le traitement (GLMM, family = nbinom2, $\chi^2 = 1,6566$, df = 7, p = 0,9764), et aucune différence n'a été détectée entre les traitements concernant le recensement des larves non-isolées (GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 2,9329$, df = 7, p = 0,8911), ni sur la masse des laves non-isolées (GLMM, $\chi^2 = 2,6547$, df = 7, p = 0,915).

Nous avons découvert que le nombre des larves pré-défécation varie significativement par rapport au contrôle (GLMM, family = nbinom2, $\chi^2 = 15,593$, df = 7, p = 0,0291). Après un test post-hoc à comparaison multiple, il s'avère qu'il s'agisse du traitement DnBP 60 ng/g qui diffère le plus du contrôle. Cependant, la masse des larves pré-défécation ne varie pas significativement selon les traitements (GLMM, family = Gamma $\chi^2 = 9,5431$, df = 7, p = 0,216).

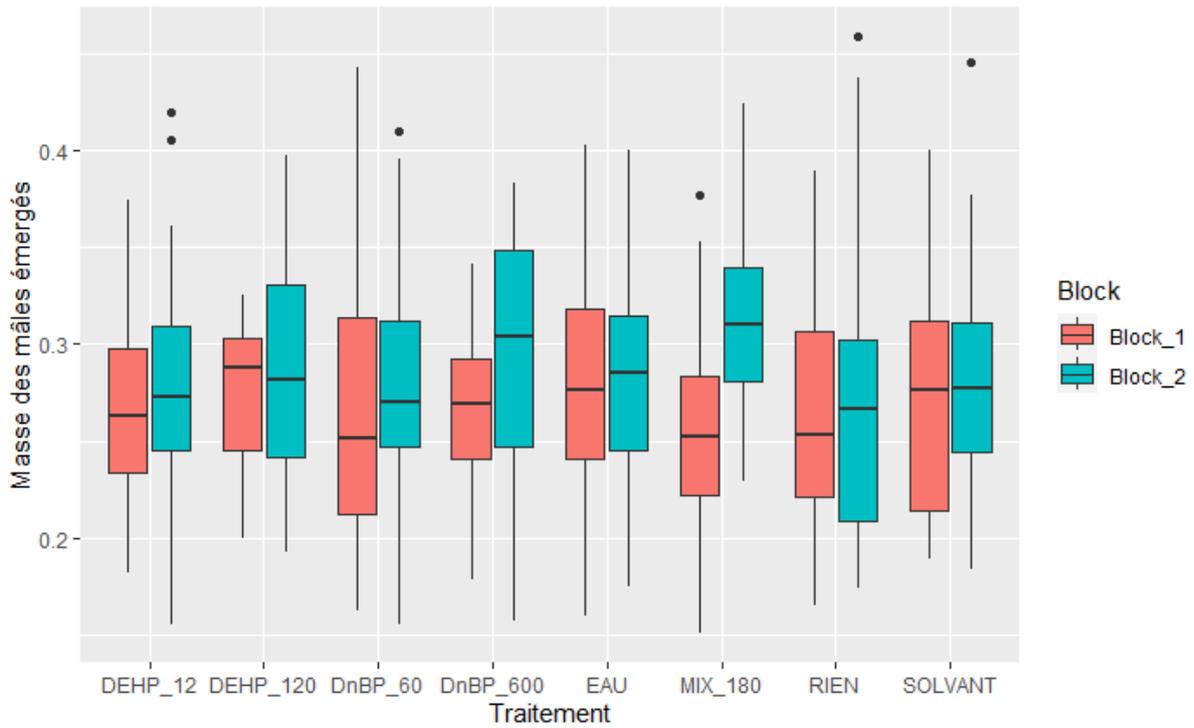
Aucune différence significative n'a été détectée entre les différents traitements sur le nombre des larves post-défécation (GLMM, family = nbinom2, $\chi^2 = 7,3512$, df = 7, p = 0,3932). Par contre, il a été détecté que leur masse varie significativement selon les traitements (GLMM,

family = Gamma, $\chi^2 = 16,337$, $df = 7$, $p = 0,02221$). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, aucun traitement ne varie significativement par rapport au contrôle.

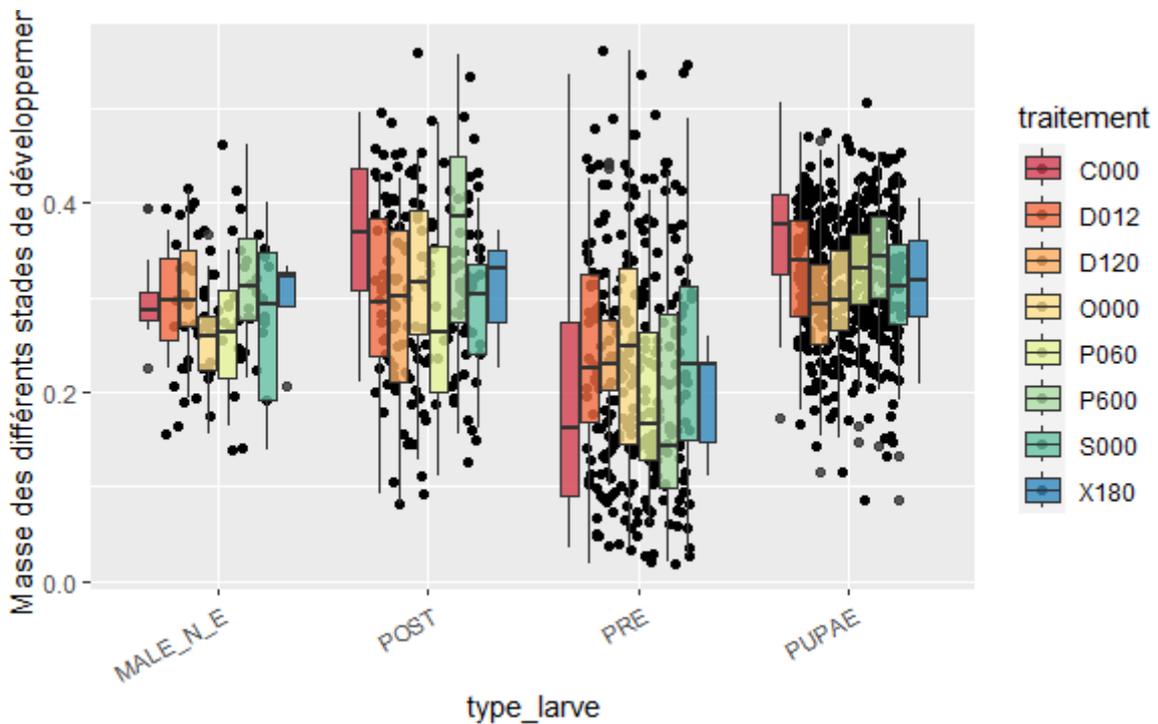
Seulement des tendances ont été détectées sur le nombre des pupes au sein des différents traitements (GLMM, family = nbinom2, $\chi^2 = 12,936$, $df = 7$, $p = 0,07368$), où le nombre des pupes du traitement DnBP 60 ng/g diffère significativement du contrôle ($p = 0,0339$) après un test pos-hoc à comparaisons multiples. On a découvert un effet significatif des traitements sur la masse des pupes (GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 23,41$, $df = 7$, $p = 0,001446$). Après un test post-hoc à comparaisons multiples, il s'avère avoir des tendance pour le traitement DEHP 120 ng/g ($p = 0,0677$) et le traitement DnBP 600 ng/g ($p = 0,0674$). C'est significatif concernant la comparaison du DEHP 120 ng/g avec le cocktail ($p = 0,0412$).



Acune relation entre le nombre des mâle non-émergés et les traitement n'a été détectée (GLMM, family = nbonim2, $\chi^2 = 11,8837$, $df = 7$, $p = 0,1045$). Cependant, nous avons détecté des effets significatifs des traitements sur la masse des mâles non-émergés (GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 18,485$, $df = 7$, $p = 0,009963$), sachant que des mâles non-émergés n'ont pas été recensés pour le bloc 1. Après un test post-hoc à comparaisons multiples, seulement des tendances ont été constatées concernant les traitements DEHP 120 ng/g ($p = 0,0945$, estimate = -0,04865) et DnBP 600 ng/g ($p = 0,523$, estimate = -0,05506).



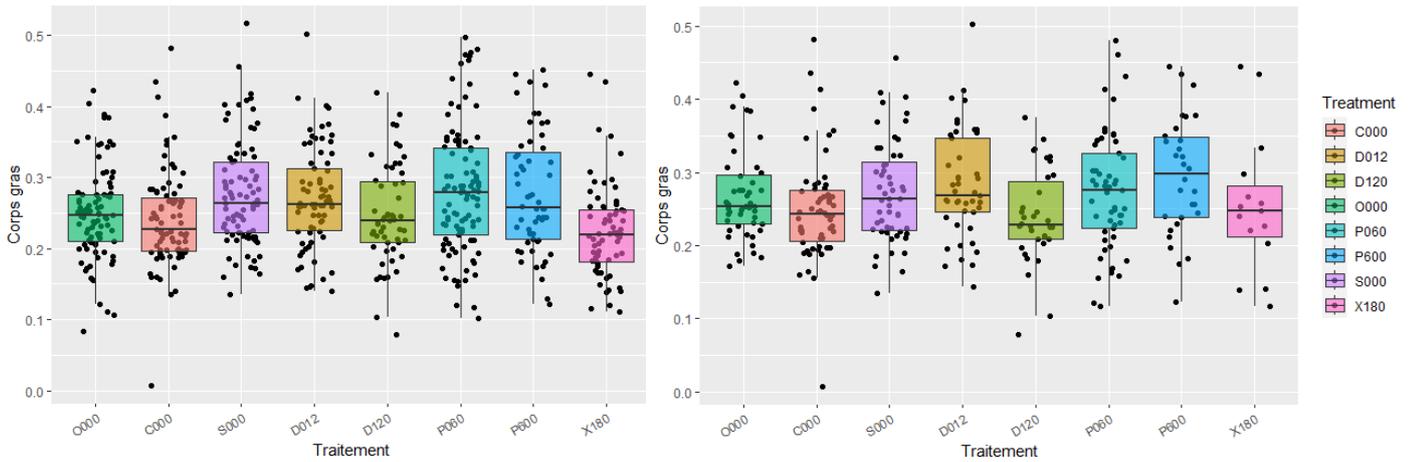
Annexe 6 : Masse des mâles émergés selon leur traitement et le bloc. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes.



Annexe 7 : Masse globale des différents stades de développement en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les données sont standardisées par la masse du couvain, les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. Les types de larves sont : larve prédéfécatoire (PRE),

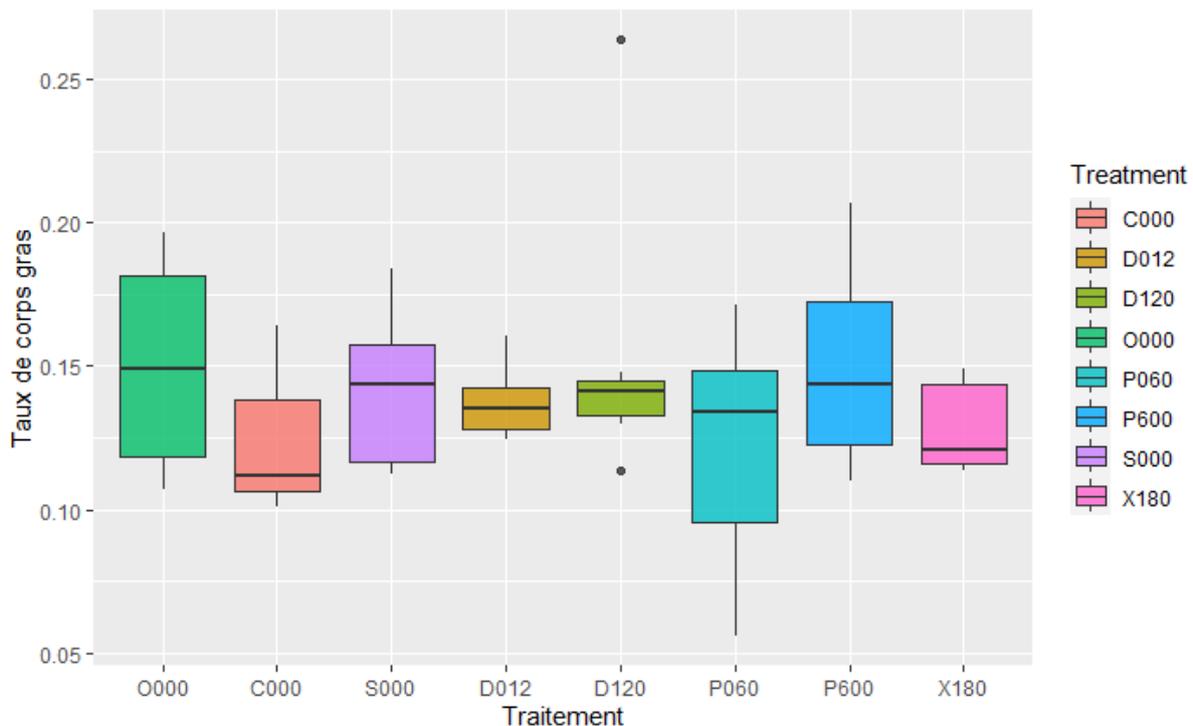
larve postdéfécatoire (POST), pupae (PUPAE) et mâles non-émergés (MALE_N_E). Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail.

La différence du nombre de mâles émergés entre les traitements n'est pas significative (GLMM, family = Gamma, $\chi^2 = 8,4737$, df = 7, p = 0,2927).

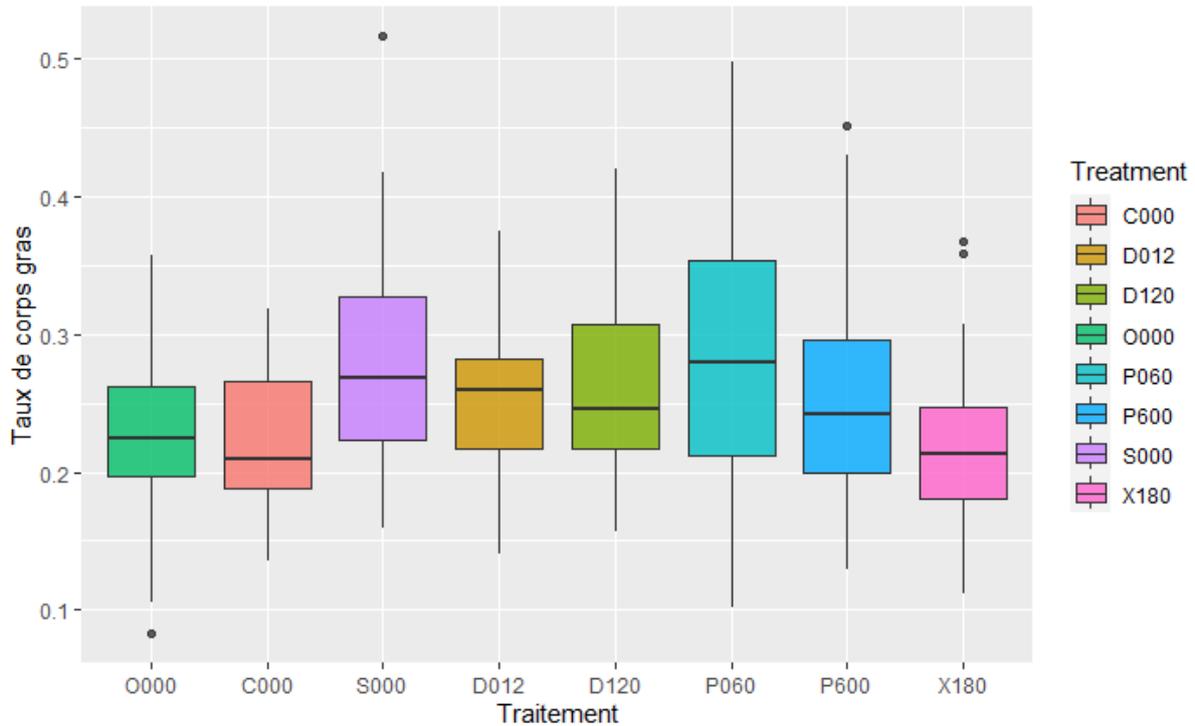


Annexe 8 : Masse des mâles en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail. **A.** Masse globale des mâles en fonction du traitement, **B.** Masse des mâles du bloc 1 en fonction du traitement.

7.3.3 Taux de corps gras



Annexe 9 : Taux de corps gras des femelles du bloc 1 en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail.



Annexe 10 : Taux de corps gras des mâles du bloc 1 en fonction du traitement. Boîtes de dispersion représentant la médiane par la ligne horizontale comprise dans l'espace inter-quartile (IQR). Les points extérieurs à l'espace inter-quartile représentent quelques valeurs extrêmes. Les acronymes des traitements sont : O000 = contrôle rien, C000 = contrôle eau, S000 = contrôle solvant, D012 = DEHP 12 ng/g, D120 = DEHP 120 ng/g, P060 = DnBP 60 ng/g, P600 = DnBP 600 ng/g, X180 = cocktail.