
Université de Mons
Faculté des Sciences
Département de biologie
Service de zoologie

Effets du Cu et du Cd sur le fitness et le développement de *Bombus terrestris*

Promoteur : Denis MICHEZ
Co-promoteur : Antoine GEKIERE

Mémoire réalisé par
Luna BREUER

Rapporteurs : Maxence GERARD
Jérôme DELROISSE

En vue de l'obtention du grade de
Master en biologie des organismes et écologie



Faculté
des Sciences

Table des matières

Remerciements.....	4
Résumé.....	5
Summary.....	7
Introduction.....	10
1.1. Problème des métaux dans l'environnement.....	10
<i>Source naturelle et anthropique</i>	10
Disponibilité dans les sols et accumulation dans les plantes.....	11
Risque sur les insectes.....	13
1.2. Etude écotoxicologique sur les abeilles.....	13
Structure d'une étude en laboratoire.....	14
Type de polluants.....	15
1.3. Risque des métaux sur les abeilles.....	16
1.3.3.1. Absorption des métaux.....	18
1.3.3.2. Détoxification.....	19
Accumulation.....	19
Excrétion.....	20
1.3.3.3. Mélanisation du tube digestif.....	20
1.4. Effet des métaux sur le fitness des abeilles eusociales.....	21
1.4.1.1. Différence d'exposition orale entre les castes.....	21
1.4.1.2. Différence de la résistance entre les castes.....	22
1.4.2.1. Voies d'exposition des larves	22
1.4.2.2. Effet des métaux sur les larves.....	24
Objectif.....	26
2.1. Expérience sur les adultes.....	26
2.2. Expérience sur le développement des larves.....	26
Matériels et méthodes.....	28
3.1. Modèle biologique et xénobiotiques étudiées.....	28
Développement et cycle de vie	28
Intérêts d'utiliser <i>B. terrestris</i>	28
3.2. Exposition des adultes au Cu et au Cd.....	30
Description du protocole OECD No. 247 2017.....	30
Réalisation des solutions.....	33
3.3. Exposition des larves au Cu et au Cd.....	35
3.4. Analyses statistiques.....	38
Détermination de la toxicité du Cu et du Cd	38
Effet des métaux sur la survie des ouvrières.....	38
<i>Effet des métaux sur la le tube digestif des ouvrières</i>	39
Effet des métaux sur la survie des larves durant leur développement.....	40
Effet des métaux sur le développement	40
Résultats.....	42
4.1. Exposition aiguë des adultes au Cu et au Cd.....	42

Comparaison de la toxicité du Cu et du Cd.....	42
Comparaison de la toxicité du Cd entre les mâles et les ouvrières.....	45
<i>Courbe de survie générale aux différents traitements</i>	46
Comparaison de la survie à forte concentration.....	46
Analyse de la noirceur du tube digestif.....	48
Analyse de la consommation et de la masse des ouvrières.....	49
4.2. Exposition chronique des larves au Cu.....	52
<i>Croissance et masse</i>	53
<i>Temps de développement</i>	54
Discussion.....	56
5.1 Effet du Cu et du Cd sur les adultes.....	56
Comparaison de la LD50 entre les ouvrières et les mâles.....	56
LD50 autres espèces.....	56
Importance des castes dans le maintien du fitness.....	57
Dégâts au tube digestif.....	59
5.2. Effet du Cu et du Cd sur le développement.....	60
Perspectives.....	62
Conclusion.....	64
Bibliographie.....	67

Remerciements

Je remercie tout d'abord Antoine Gékière d'avoir été notre mentor durant tout le long de mon mémoire, je remercie sa patience et sa connaissance sur le sujet. Je remercie aussi Luca Dorio, mon coéquipié avec qui j'ai réalisé les recherches.

Je remercie aussi chaleureusement toutes les personnes qui ont bien voulu venir nous aider dans nos manipulations. Un grand merci à Dimitri de nous avoir fournis et confectionné le matériel pour nos expériences. Aussi un grand merci à lui de nous avoir aidé dans certaines manipulations. Je remercie aussi chaleureusement Maxence Gérard de nous avoir aidé dans nos manipulation et apporté son savoir sur la recherche. Et enfin je remercie pour l'aide de mon amie de classe Audrey Pinchon.

Merci à toutes les personnes du laboratoire qui nous ont soutenu dans ce grand parcours, merci a Denis Michez, chef de labo sans qui tout cela n'aurait pas pu se faire.

Merci à tous mes amis de classe qui m'ont toujours soutenu, que ce soit au niveau de l'aide a propos de mes connaissances mais aussi émotionnellement, et je souhaiterais remercier particulièrement Dylan Delporte et Victor Wilmet qui ont été un soutient essentiel si ce n'est crucial dans mon parcours.

En dehors du laboratoire, je remercie de tout cœur mes amis et toute ma famille qui m'ont aussi soutenu et qui m'ont aussi aidé comme ils pouvaient dans l'écriture de mon mémoire.

Résumé

Il existe beaucoup de xénobiotiques d'origine anthropique dans l'environnement pouvant avoir un impact néfaste sur la biodiversité et plus précisément sur les abeilles. Les métaux sont un de ces polluants dont l'impact n'a été que très peu étudié et est donc peu compris. Dans ce mémoire, nous avons donc débuté les prémisses de recherches visant à comprendre l'effet toxique des métaux sur le fitness et le développement des abeilles et plus précisément de *Bombus terrestris*. Pour ce faire deux métaux que sont le cuivre (Cu), un métal essentiel, et le cadmium (Cd), un métal non-essentiel, ont été utilisés et ce pour répondre à trois questions biologiques.

La première question est de comprendre à quel point le Cu et le Cd sont toxiques pour les ouvrières et les mâles. Pour ce faire, le protocole expérimental OECD revisité pour les abeilles par l'équipe Poshbee a été réalisé afin de calculer la LD50 qui est une valeur de toxicité officielle utilisée afin de réaliser des comparaisons. Cette valeur a donc par la suite été utilisée pour comparer la toxicité du Cu et du Cd et la toxicité entre les ouvrières et les mâles. L'obtention de cette valeur a été réalisée par exposition orale aiguë et le range de concentrations proviennent de concentrations retrouvées dans la littérature scientifique, ces concentrations ne sont donc pas représentatif de ce qu'on retrouve dans l'environnement. Les résultats de cette expérience ont montré que la LD50 calculée était beaucoup plus élevée que les concentrations environnementales, que cette valeur n'était pas différente entre les ouvrières et les mâles et que le Cd, un métal non-essentiel, était 19 fois plus toxique que le Cu.

La deuxième question biologique est une question qui est en rapport avec les causes de l'intoxication au Cu et au Cd. Pour cette question, nous nous sommes donc penchées sur leur effet au niveau du système digestif, car il semblerait que celui-ci soit particulièrement atteint. Pour ce faire, une dissection du système digestif des ouvrières après exposition a été réalisée. Différents paramètres en rapport avec la physiologie digestive comme la consommation et le poids ont aussi été mesurés. Les résultats montrent une noirceur du tube digestif pouvant potentiellement être en accord avec le système de détoxification des métaux et aussi une possible mélanisation du tube digestif, les métaux auraient donc aussi un impact sur le microbiote des adultes. Cependant, ces effets ne sont observé qu'au dose environnante ou supérieur à la LD50, ces effets sont donc sûrement rarement rencontré dans l'environnement.

Enfin, pour la dernière question biologique, nous nous sommes posé la question de savoir si à des concentrations environnementales, il était possible que le Cu ait un impact sur le développement de *B. terrestris* et donc des bourdons sociaux. Pour ce faire, nous avons nourri avec de la nourriture contaminée en métaux des larves isolées dans des plaques multipuits et mit en couveuse dans un incubateur. Par la suite, différents paramètres du développement ont été contrôlés que sont la mortalité, la croissance des larves, le poids après l'émergence et le temps de développement pour les larves, les pré-pupes et les pupes. Les pré-pupes étant le stade après défécation et avant l'acquisition de la morphologie nymphale. Les résultats de cette expérience montrent une accélération de la défécation de 2 jours des larves, un phénomène pouvant s'expliquer par le stress engendré par le Cu. Il est possible que pour se détoxifier, les larves accélère leur défécation ce qui a pour conséquence d'accélérer le moment de nymphose.

En conclusion, le Cu et le Cd n'ont des effets létaux sur les adultes qu'à fortes concentrations qui sont loin d'être ce qui est retrouvé dans l'environnement. Il semblerait que la masse soit un des facteurs principale influençant la mortalité chez les ouvrières et les mâles et que le système digestif soit particulièrement touchée. Une piste sur les causes de l'intoxication des métaux au niveau du système digestif est donc ouverte. Pour le développement, il semblerait que la sensibilité des larves fait qu'une exposition orale à dose environnementale, et donc très faible par rapport à la LD50 des adultes rapporté, soit assez élevé pour avoir un impact sur le développement en accélérant la défécation. Évaluer l'impact des métaux n'est donc pas qu'une question d'effet sur les adultes, mais aussi d'effet sur les larves et leur développement.

Summary

Metals are natural elements that can be introduced into the environment through human activity. This introduction can make it toxic to biodiversity, particularly to insects like bees. The purpose of this study is to identify the effects of copper and cadmium on bumblebees, specifically on their fitness and development, to assess the potential environmental toxicity of these metals. To identify these effects, three biological questions were posed.

The first question is whether the toxicity of copper is comparable to that of cadmium and whether there is a difference in toxicity between worker bees and males of *Bombus terrestris*. The second question explores the effects of copper and cadmium on the digestive tract of worker bees. Finally, the third question examines how these metals affect the development of *Bombus terrestris*.

To address these questions, three experiments were conducted. The first experiment involved an oral acute exposure of copper and cadmium to worker bees and males to determine the LD50 (lethal dose for 50% of the population). This experiment was conducted using the OECD standardized protocol. The second experiment involved dissecting the digestive tract of workers that had been previously exposed to the metals. The final experiment involved the chronic oral exposure of larvae in multiwell plates in an incubator to observe the effects of copper on mortality, development time, and larval growth.

The results of these three experiments indicate that copper is 19 times less toxic than cadmium, a logical finding given that cadmium is a non-essential metal that is highly toxic to all organisms. The resistance between workers and males did not differ for these two metals, suggesting that the principal factor influencing mortality is body weight rather than sexual differences. Regarding the digestive tract, significant cell death was observed at high concentrations, around or above the calculated LD50. Additionally, larvae exposed to copper defecated two days earlier than expected, which accelerated pupation.

In conclusion, the toxicity of copper and cadmium does not pose a significant threat to adult bumblebees, as the LD50 values found were at concentrations typically not encountered in the field. However, even though these concentrations are not immediately dangerous, understanding the mechanisms of oral toxicity is crucial for preventive measures. Conversely, copper, even at

environmental concentrations, affects larval development, highlighting the need for further research into its toxic mechanisms.

Introduction

1.1. Problème des métaux dans l'environnement

1.1.1. Pourquoi évaluer le risque des métaux dans l'environnement ?

Les éléments en traces métalliques et métalloïdes (ci-après « métaux »), couramment appelés « métaux lourds » sont des éléments métalliques non-synthétiques présents de manière naturelle dans les sols à l'état de trace, donc à une concentration inférieure à 1 g/kg. Ils représentent 76 éléments du tableau périodique de Mendeleïev (Gekière, Vanderplanck, et Michez 2023). Parmi ces métaux, on distingue plusieurs types d'éléments tels que les métaux lourds mais aussi les métaux de transition, de post-transition, alcalino-terreux ou terreux, mais une catégorie particulière de métaux nous intéresse ; ce sont les métaux essentiels et non-essentiels (Rashid et al. 2023). Un métal essentiel est un métal indispensable au bon fonctionnement de l'organisme, il est retrouvé notamment en tant que cofacteur dans beaucoup d'enzymes. Alors qu'un métal non-essentiel ne possède aucune fonction physiologique chez les êtres vivants, celui-ci est toxique en très faible quantité (**Figure 1**) (Wright et Baccarelli 2007).

Source naturelle et anthropique

La présence naturelle de ces métaux est le fruit de plusieurs phénomènes que sont la remontée de magma granitique, l'érosion et les feux de forêt (Goff et Bonnomet 2004). Mais l'activité humaine, telle que les activités de production, la combustion de combustibles fossiles, l'extraction de métaux, l'utilisation de pesticides et d'engrais agricole, ainsi que le rejet des eaux usées domestiques, entraîne une augmentation des niveaux de métaux dans l'environnement, dépassant ainsi les apports naturels (Zhang et Wang 2020). Cette hausse de la concentration des métaux est potentiellement dangereuse pour la biodiversité en raison de leur toxicité, de leur persistance dans l'environnement et de leur risque de bioaccumulation dans la chaîne trophique (Ali, Khan, et Ilahi 2019 ; Tibbett et al. 2021). De plus, il est important de prendre en compte la nature du métal car ceux-ci présentent des toxicités différentes, avec une toxicité particulièrement élevée pour les métaux non-essentiels. La durée biologique élevée des métaux non-essentiels fait que ceux-ci peuvent s'accumuler dans les sols pendant des décennies, créant ainsi un risque important pour l'environnement (Matech et al. 2014 ; Jaishankar et al. 2014).

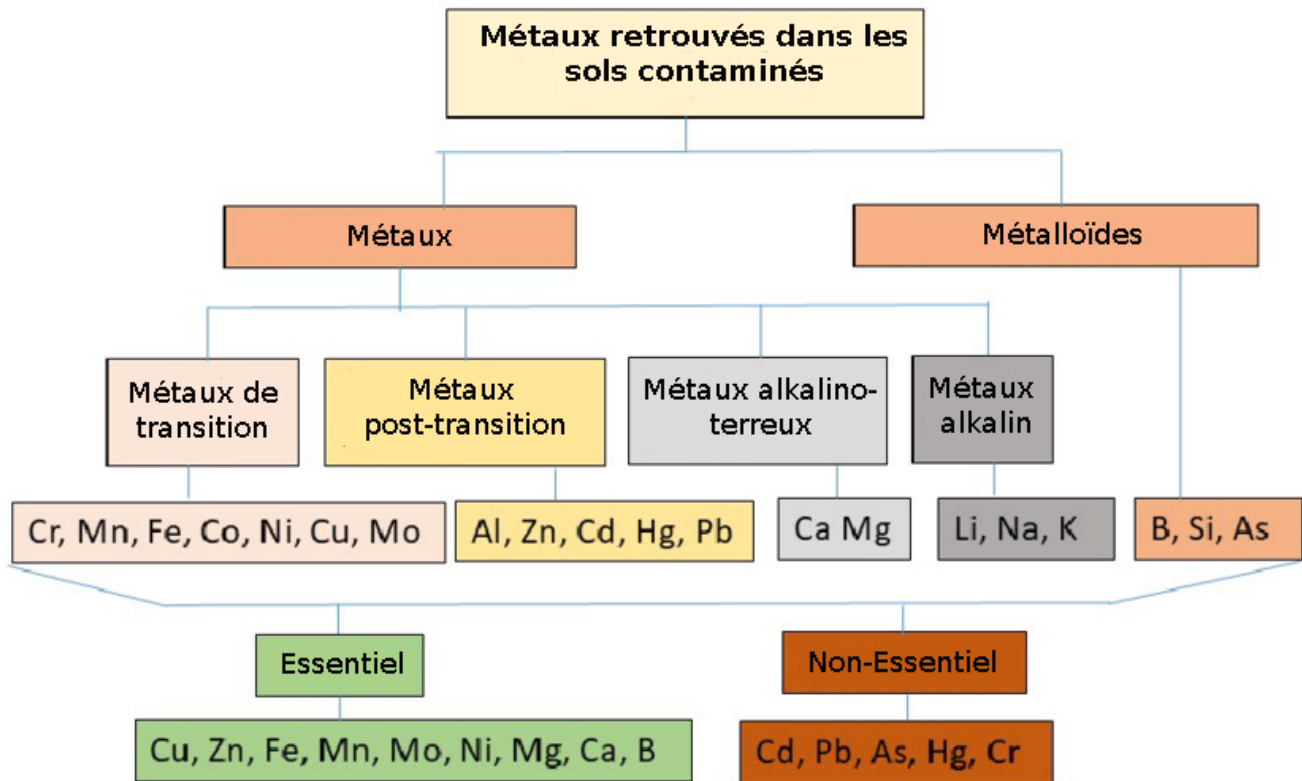


Figure 1. Schéma de la classification des métaux retrouvés dans les sols contaminés et non-contaminés.
 Inspiré de l'article de Rashid et al. 2023.

1.1.2. Transport des métaux du sol aux plantes / insectes

Disponibilité dans les sols et accumulation dans les plantes

La présence naturelle de métaux n'est généralement pas toxique pour les organismes, mais ils le deviennent lorsqu'ils sont introduits dans l'environnement par l'activité humaine, car leur concentration dépasse le seuil de non-toxicité (Matech et al. 2014). Les métaux sont présents dans les sols par leur liaison avec des minéraux inorganiques ou de la substance humique organique ; cette liaison se produit par leur capacité de sorption qui leur permet de pénétrer (absorption) et de s'attacher (adsorption) dans le sol (Sparks 2005 ; Violante et al. 2010). Afin que les métaux soient biodisponibles, ils doivent tout d'abord être libérés du sol où ils ont été fixés, puis rester sous forme d'ions libres ou se lier à des composés organiques (Goff et Bonnomet 2004) ; (Violante et al. 2010). Une fois le métal biodisponible, celui-ci peut être absorbé et s'accumuler dans divers tissus végétaux et *in fine* se retrouver dans les tissus floraux (Clemens, Palmgren,

et Krämer 2002 ; Xun et al. 2017 ; Yan et al. 2020) . Cette accumulation dans les tissus floraux accroît le risque de bioaccumulation des métaux dans la chaîne alimentaire (Sarker et al. 2022), en commençant par l'accumulation de ces éléments chez les herbivores (**Figure 2**) (Tibbett et al. 2021).

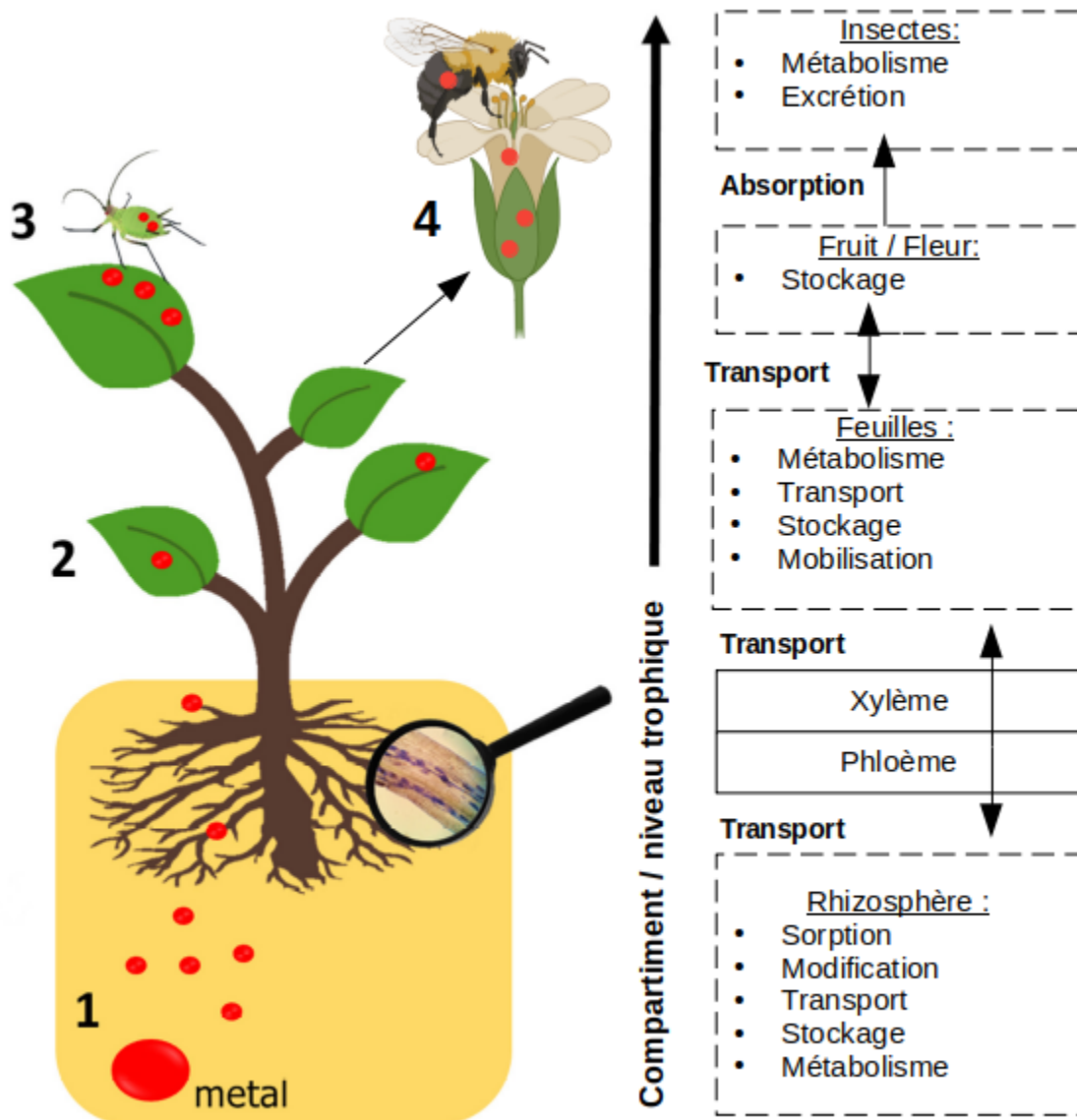


Figure 2. Voie d'exposition orale des insectes aux métaux par leur bioaccumulation dans les plantes. Cette figure illustre les échanges de métaux dans la chaîne trophique sol/plante/insecte. Le devenir des métaux dans certains tissus floraux est aussi rapporté. Figure modifiée de l'article de Tibbett et al. 2021 et de (Cataldo, Wildung, et Garland 1987).

Risque sur les insectes

Les insectes sont des organismes essentiels dans la structure des écosystèmes : ils peuvent jouer le rôle de décomposeurs, d'herbivores ou de prédateurs. L'évaluation des risques de leur extinction est donc importante pour la conservation de la biodiversité (Miller 1993), surtout que d'autant plus ils fournissent des services écosystémiques essentiels tels que l'approvisionnement en nourriture, la pollinisation des plantes, l'enfouissement des excréments, la lutte contre les parasites et la nutrition de la faune (Skaldina et Sorvari 2019). Les métaux peuvent entrer en contact direct avec ces insectes et ce par plusieurs voies, qui incluent l'ingestion, l'inhalation et l'absorption cutanée (Sparks 2005).

Le phénomène de bioaccumulation des métaux dans les tissus floraux rend les insectes herbivores particulièrement sensibles aux métaux, surtout par voie orale (Xun et al. 2017) ; (Tibbett et al. 2021). La forme des métaux dans la plante est importante, car même si ces éléments sont présents dans les tissus végétaux, les formes insolubles complexés à la paroi végétale ne sont pas directement disponibles. Par contre, les métaux présents dans divers fluides végétaux tels que le nectar ou la sève sont directement assimilables par les organismes car ceux-ci sont présents sous forme ionique (Cataldo, Wildung, et Garland 1987). Parmi ces insectes herbivores se trouvent les insectes pollinisateurs, qui jouent un rôle crucial en contribuant à la diversité botanique terrestre et en participant à la régulation des cycles des nutriments et de l'énergie. Les abeilles (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) constituent le principal groupe de pollinisateurs en raison de leur grande efficacité dans les écosystèmes où elles se trouvent (Carnell, Hulse, et Hughes 2020).

1.2. Etude écotoxicologique sur les abeilles

Il est reconnu que les populations d'abeilles sont en déclin. Les causes de ce déclin sont multiples et l'apport de polluants d'origine anthropique dans l'environnement est un facteur non négligeable de ce déclin (Potts et al. 2016 ; LeBuhn et Vargas Luna 2021). Les abeilles sont particulièrement importantes pour les écosystèmes, notamment parce qu'elles participent à la pollinisation de la plupart des cultures et fleurs sauvages (Potts et al. 2016). Donc leur proximité notamment des zones agricoles fait que ces insectes sont particulièrement à risque d'exposition aux polluants anthropiques ce qui rend leur étude en écotoxicologie très pertinente. L'espèce modèle généralement utilisé en laboratoire pour ce groupe est *Apis mellifera* ([Lyubenova et al. 2016](#)). Ce choix n'est pas forcément approprié pour évaluer la vulnérabilité des Anthophila, malgré sa facilité d'acquisition, car sa résistance à plusieurs xénobiotiques est plus élevée que

d'autres espèces, l'utilisation d'une espèce sensible est un choix plus adapté (Van der Steen et al. 2012 ; Arena et Sgolastra 2014).

Structure d'une étude en laboratoire

Les prémisses d'une étude en écotoxicologie se réalisent par des expériences en laboratoire. Le schéma expérimental pour caractériser la toxicité d'un composé et évaluer sa dangerosité intrinsèque est souvent le même (**Figure 3**). Cette caractérisation se fait en utilisant des bioessais sur des organismes modèles, mais il est également possible d'employer d'autres modèles d'étude, allant de la cellule, qui fournit une réponse précise de l'intoxication, à une population, qui offre une réponse plus représentative de celle observée *in situ* (Lyubenova et al. 2016) ; (Zhou et al. 2019). La mortalité est l'un des paramètres les plus étudiés pour caractériser la toxicité des polluants et est généralement évaluée par des expositions aiguës, orales ou cutanées (Garric 2009) ; (Lyubenova et al. 2016). Bien que l'évaluation des effets létaux soit importante, il est également essentiel de déterminer les effets sublétaux tels que la capacité de reproduction, la croissance, le développement et le comportement ; ces effets sont généralement évalués au travers d'expositions chroniques à des concentrations environnementales (Lyubenova et al. 2016).

La létalité d'un polluant est évaluée par des protocoles de laboratoire standardisés réalisés par l'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (OECD 2024). Ces protocoles standardisés permettent de calculer la LC50 (concentration létale 50%) et plus généralement la LD50 (dose létale 50%) (Calow et Forbes 2003 ; Pillai et al. 2021) ; ces valeurs permettent de déterminer le niveau de résistance des populations (Bakr et al. 2010) et de comparer la toxicité des polluants. La différence entre ces deux valeurs est que la LC50 est mesurée en unité de concentration (g de polluant / ml de solvant), alors que l'unité de mesure de la LD50 est une dose par individus (g de polluant / individu), cette dernière étant donc plus précise pour déterminer la toxicité du produit. Cette valeur est encore plus précise lorsqu'elle est standardisée avec la masse (mg) (L. M. da Costa et al. 2015).

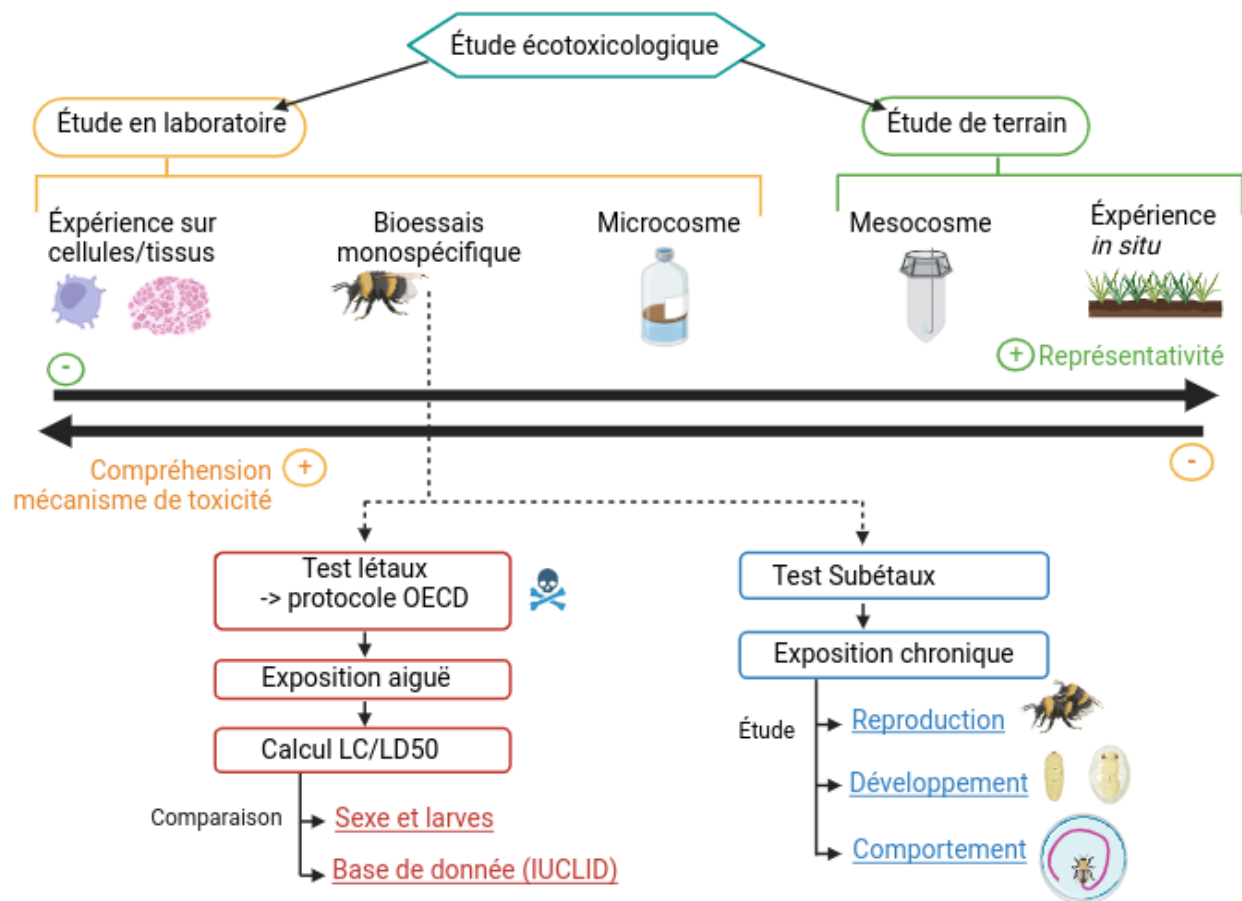


Figure 3. Schéma du protocole expérimental pour étudier l'impact des métaux sur des abeilles en laboratoire dans le contexte d'une étude écotoxicologique. OECD = Organisation de coopération et de développement économiques, LD/LC50 = létale dose/concentration 50 %, IUCLID = International Uniform Chemical Information Database. Figure réalisée sur BioRender.

Type de polluants

Il existe différents polluants en écotoxicologie étudiés pour leur toxicité : ce sont les produits de l'agriculture comme les fertilisants et les pesticides, les micropolluants industriels comme les PCB (Polychlorobiphényle) ou le dioxin, les substances émergentes comme les composés perfluorés et les métaux lourds (Pourret, Bollinger, et Hursthouse 2021). Une attention particulière a été mise sur les pesticides, pour lesquels il existe des bases de données répertoriant leur toxicité comme l'IUCLID (International Uniform Chemical Information Database) (Richardson et Bopp 2012).

Bien que les pesticides soient les polluants les plus étudiés pour leur toxicité envers les pollinisateurs (Sánchez-Bayo 2021), les métaux présents dans l'environnement peuvent aussi avoir un impact négatif sur les populations d'abeilles (Moroñ et al. 2012). Il est donc crucial de déterminer leur toxicité en raison de leur apport anthropique (Zhang et Wang 2020) et des risques qu'ils posent pour les organismes ([Jaishankar et al. 2014](#)).

1.3. Risque des métaux sur les abeilles

1.3.1. Voies d'expositions générale

Une des voies d'exposition les plus importantes est l'ingestion ; cette voie est causée par la présence de métaux dans les ressources florales, comme le nectar et le pollen (Hladun, Parker, et Trumble 2015), surtout lorsque les plantes poussent dans des zones fortement polluées, comme les zones urbanisées (Kalbande et al. 2008). La présence de métaux dans ces tissus expose directement les abeilles adultes mais aussi les jeunes, car elles utilisent le nectar et le pollen pour leur alimentation et le maintien du couvain, en particulier les espèces sociales comme certains bourdons (Tepedino et Parker 1982 ; Gradish et al. 2019). Les métaux peuvent aussi se trouver dans les liquides de guttation des plantes, exposant les abeilles lorsqu'elles s'hydratent (Gradish et al. 2019). Une autre voie d'exposition est la voie cutanée : cette voie est causée par la présence de métaux dans l'environnement et notamment dans les feuilles (Yan et al. 2020) et le sol (De Temmerman et al. 2003), exposant les abeilles qui utilisent ces éléments pour confectionner leur nid, dont les espèces sociales (Gradish et al. 2019). Une dernière voie importante d'exposition des abeilles est la voie respiratoire qui est causée par la présence de métaux dans l'atmosphère (A. Costa et al. 2019) ; (Sparks 2005). Parmi ces trois voies d'exposition, la voie orale causée par la contamination des ressources florales est une des voies les plus à risque (Leita et al. 1996).

1.3.2. Utilité et toxicité générale

L'utilisation physiologie et la toxicité des métaux chez les insectes n'ont été que peu étudiées dans la littérature scientifique et ne sont pas totalement comprises. La description de l'effet des métaux dans cette partie prend en compte l'effet de métaux sur les cellules animales de manière générale et leur effet physiologique sur tout type d'insectes à cause du manque de spécificité sur les abeilles.

Les métaux sont intéressants d'un point de vue biochimique en raison de leur capacité de valence multiple, ce qui leur permet d'être utilisés comme groupes prosthétiques dans les sites actifs de certaines enzymes,

des pigments respiratoires, des métalloprotéines et d'autres éléments biologiques (Valko, Morris, et Cronin 2005) ; (Koo 2023). Les métaux peuvent aussi avoir un rôle dans le transfert d'énergie, la signalisation et l'équilibre redox et acido-basique (Ziller et Fraissinet-Tachet 2018), mais lorsque ceux-ci sont présents en trop grande quantité, si le système de détoxification de l'organisme ne peut pas les gérer, ils deviennent toxiques (van Straalen et Roelofs 2005). En cas d'intoxication, les métaux sont nocifs pour les organismes, car ils entraînent un stress oxydatif en modifiant la concentration de ROS dans le cytosol, et en altérant les protéines par leur interaction avec les groupements thiols, imidazoles et carboxyles, ce qui a pour conséquence de troubler plusieurs processus cellulaires et physiologiques (Jaishankar et al. 2014 ; Kim, Kim, et Kumar 2019). Le potentiel de toxicité des métaux fait que ceux-ci sont maintenus à un équilibre précis, avec une absorption, une distribution, une accumulation et une excrétion finement régulée ([Kim, Kim, et Kumar 2019](#)); il est donc important de prendre en compte ces aspects pour comprendre leur utilisation par l'organisme.

1.3.3. Processus de gestion des métaux dans le tube digestif

Comme mentionné précédemment, les abeilles peuvent être exposées aux métaux via diverses voies dont l'ingestion qui est l'une des plus à risque (Leita et al. 1996 ; Tibbett et al. 2021). Le système digestif des insectes se compose de trois parties principales : l'intestin antérieur, l'intestin moyen et l'intestin postérieur (**Figure 4**) (Nation 2016).

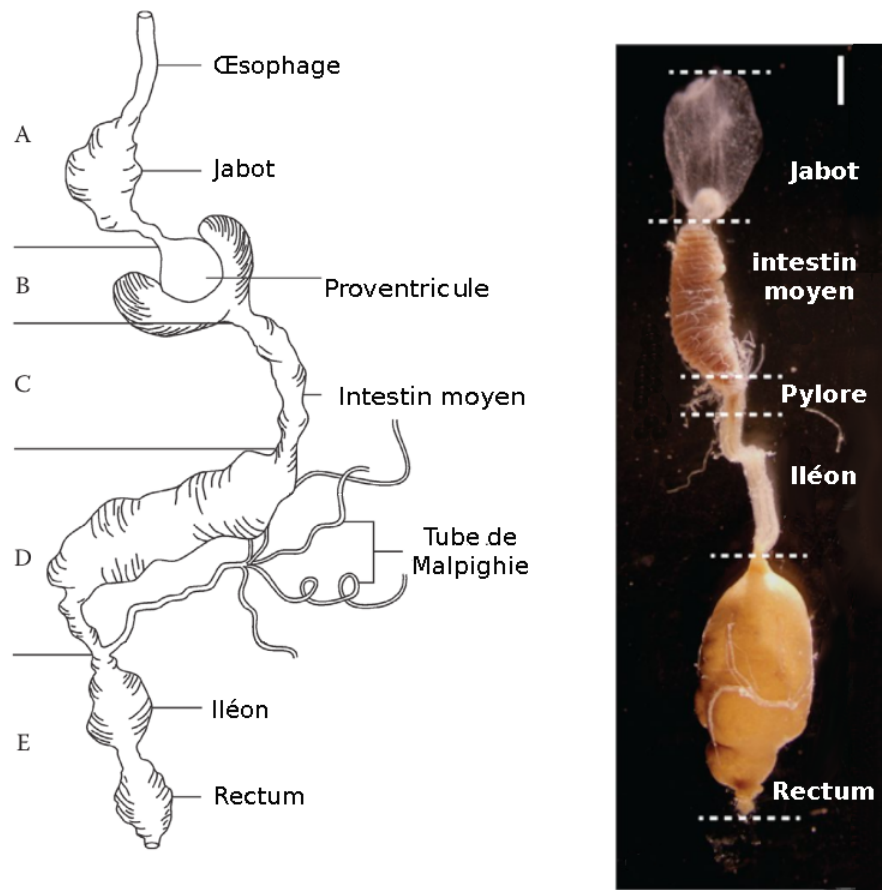


Figure 4. Schéma et photo du tube digestif des abeilles. Le schéma illustre le tube digestif des insectes. A : intestin antérieur, B : partie de l'intestin antérieur avec le proventricule et les caeca digestifs, C : l'intestin moyen, D : la partie antérieure de l'intestin postérieur, E : la partie postérieure de l'intestin postérieur. Ce schéma a été modifié du livre "Insect Physiology and Biochemistry" de Nation de 2016 (Nation 2016). Photo du tube digestif d'*Apis mellifera* adulte provenant de l'article de Engel et al. 2015. Le rectum est rempli de pollen, la barre d'échelle représente 1 mm (Engel, Bartlett, et Moran 2015). Image réalisée sur GIMP.

1.3.3.1. Absorption des métaux

L'absorption des métaux se fait principalement au niveau de l'intestin moyen, où ont également lieu les processus de détoxification des xénobiotiques (Dabour et al. 2019). Les cellules cylindriques sont les cellules majoritaires du tube digestif, ce sont elles qui absorbent les molécules du bol alimentaire et qui

forment une première barrière dans l'absorption des métaux en gérant leur toxicité par leur accumulation (Ballan-Dufrançais 2002 ; Nation 2016).

Les métaux sont absorbés sous forme d'ions libres et donc ne peuvent pas entrer dans les cellules par simple diffusion, mais au travers de transporteurs actifs ou d'une diffusion facilitée par des canaux ioniques. Un métal peut être absorbé par plusieurs moyens et comme les propriétés physico-chimiques de ceux-ci sont parfois similaires, ces systèmes de transports ne sont pas très sélectifs entre métaux différents et donc les métaux non-essentiels peuvent aussi passer par ces transporteurs (Craig, Hare, et Tessier 1999 ; [Tibbett et al. 2021](#)). Parmi les transporteurs actifs, il existe les transporteurs Malvolio (Mvl), qui permettent d'absorber le Cu au niveau de l'intestin moyen et qui utilisent un gradient de proton (Folwell, Barton, et Shepherd 2006) et les transporteurs ZIP retrouvé au niveau des cellules de l'intestin moyen ou tu tube de Malpighi (Xiao et al. 2014 ; Khan et Lang 2023). Les métaux peuvent aussi passer indirectement par des transporteurs qui ne leur sont pas destinés comme c'est le cas des canaux Ca^{2+} qui régulent l'équilibre électrochimique des cellules (Poteat et Buchwalter 2014). Tous ces transporteurs sont liés à la régulation de l'homéostasie électrochimique et ionique des cellules (Dow 2017) ; les ions métalliques peuvent donc perturber cet équilibre par leur impact sur ces transporteurs (Ryu et al. 2004 ; Missirlis et Oliveira 2022).

1.3.3.2. Détoxification

Une fois les métaux absorbés, ceux-ci sont utilisés dans diverses voies biochimiques, mais de par la non spécificité d'absorption et les risques d'overdose, il est important que ceux-ci soient détoxifiés. Pour gérer la toxicité des métaux, les insectes utilisent deux modes de fonctionnement que sont l'accumulation et l'excrétion.

Accumulation

L'accumulation des métaux se réalise au travers de leur séquestration dans les lysosomes sous forme de sphérites minéralisées dans différents tissus tels que les cellules intestinales, les tubes de malpighi et les corps gras (Ballan-Dufrançais 2002 ; Polidori et al. 2018), ou par leur liaison à des métallothionéines qui sont des protéines soufrées qui sont des chélateurs d'ions métalliques de part leur résidus cystéines multiples. Ces métallothionéines sont un des systèmes majeurs de gestion de l'homéostasie des métaux (Ziller et Fraissinet-Tachet 2018 ; Yiwen et al. 2022), il est possible de les utiliser en tant que biomarqueurs physiologiques du stress métallique (Lu, Wu, et Ding 2018). La production des métallothionéines est régulée au niveau transcriptionnel et traductionnel ; elles peuvent être produites dans tous les

compartiments cellulaires, dans tous types de tissus et durant tous les stades de développement des insectes (Lauverjat, Ballan-Dufrançais, et Wegnez 1989 ; Liu et al. 2014 ; Ziller et Fraissinet-Tachet 2018).

Les métaux peuvent traverser la barrière épithéliale intestinale et s'introduire dans le soma, permettant ainsi leur circulation dans l'organisme entier grâce à l'hémolymphe. Dans ce cas, ces éléments peuvent se stocker dans d'autres tissus que les cellules intestinales tels que les corps gras (Leonard et al. 2009 ; Al-Naggar et al. 2013). Le problème écologique majeur de cette accumulation est que celle-ci risque de provoquer un phénomène de bioaccumulation dans la chaîne trophique (Cheruiyot et al. 2013). C'est pourquoi il est important de contrôler ce phénomène pour le bon maintien des structures écologiques.

Excrétion

Pour gérer la toxicité des xénobiotiques, les insectes ont développé un système de détoxification générale permettant d'évacuer les molécules toxiques et utilisant divers enzymes de détoxification tels que les cytochromes P450, les glutathion-S-transférases et certains transporteurs actifs (Berenbaum et Johnson 2015). Cependant, il est probable que ce système ne soit pas le système principal utilisé pour la gestion des métaux.

L'excrétion des métaux peut se faire au travers de l'urine formée par les tubes de Malpighi (Leonard et al. 2009 ; Dow 2017) ou par l'excrétion des cellules cylindriques de l'intestin moyen mortes après leur accumulation (Vandenbulcke et al. 1998). Lorsque les métaux sont accumulés en trop grande quantité, ils provoquent la nécrose de ces cellules cylindriques et les fragments nécrosés sont rejetés dans le lumen, ce qui provoque une diminution de l'épaisseur de l'épithélium (Vandenbulcke et al. 1998 ; Bednarska et al. 2016 ; Dabour et al. 2019). C'est par ce phénomène qu'il est possible de retrouver des métaux dans les fèces des insectes (Heliövaara et Väisänen 1990).

1.3.3.3. Mélanisation du tube digestif

Un stress produit au niveau de l'intestin peut engendrer une réponse immunitaire et induire la mélanisation de l'épithélium du tube digestif, notamment au niveau du pylore (Engel, Bartlett, et Moran 2015). La mélanisation est le résultat de la polymérisation de la quinone qui est produite par une enzyme appelée la phénoloxydase, ce processus physiologique a pour fonction d'encapsuler les agents pathogènes et est réalisé par les cellules immunitaires des insectes (Khan et Lang 2023). Le processus de mélanisation est dépendant de l'utilisation de certains métaux tels que le Cu qui est utilisé en tant que cofacteur pour oxyder le phénol

en quinone (González-Santoyo et Córdoba-Aguilar 2012 ; Khan et Lang 2023). Malgré leur utilité dans le bon fonctionnement du système immunitaire, en condition non physiologique, les métaux peuvent induire un stress et causer la mélanisation par leur capacité à augmenter la prolifération de bactéries pathogènes (Ladomersky et Petris 2015). La prolifération de bactéries pathogènes induit la stimulation des PRR (Pattern Recognition Receptors) qui sont les initiateurs de la mélanisation (Binggeli et al. 2014 ; Emery, Schmidt, et Engel 2017).

1.4. Effet des métaux sur le fitness des abeilles eusociales

La plupart des abeilles domestiques utilisées pour la pollinisation des champs sont eusociales ; c'est avantageux car la forte production d'individus permet de polliniser de grandes surfaces agricoles (Thakur 2012). L'évaluation de l'impact d'un polluant sur le cycle de vie des abeilles eusociales doit tenir compte de leur structure hiérarchique. Cette structure est composée de trois castes que sont les reines qui s'occupent de la fondation de la colonie et de la reproduction, les ouvrières qui s'occupent du maintien du couvain et les mâles qui permettent de fertiliser les nouvelles reines (Fayet 2012). Il est donc important d'évaluer la toxicité des métaux sur ces différentes castes. De plus, le maintien du fitness est aussi lié au bon développement des individus ; c'est pourquoi il est également essentiel d'évaluer l'effet des métaux sur les différents stades de développement (Gradish et al. 2019b) que sont les larves, les pré-pupes, qui est le stade après la défécation des larves, et les pupes.

1.4.1. Risque sur les abeilles adultes

1.4.1.1. Différence d'exposition orale entre les castes

Les divergences écologiques entre les ouvrières et les mâles chez les bourdons eusociaux entraînent des variations de leur exposition aux métaux. Le rôle des ouvrières au sein de la colonie est réparti en trois tâches : le maintien du couvain, la thermorégulation de la colonie et la recherche de nourriture (Hogeweg et Hesper 1983 ; Foster et al. 2004). L'exposition orale des ouvrières passe, dans un premier temps, par les butineuses qui vont chercher les ressources florales. Ces ressources peuvent ensuite s'accumuler dans la colonie, surtout au niveau des réserves nutritives, ce qui aura pour conséquence de contaminer les ouvrières qui maintiennent la colonie et les larves (Gradish et al. 2019b). Les mâles, après leur émergence, restent un temps dans la colonie avant de la quitter pour aller chercher une nouvelle reine à féconder. Ils peuvent être exposés par voie orale car ils butinent pour subvenir à leurs propres besoins alimentaires et par leur présence pendant un temps dans la colonie. L'aire de distribution des mâles peut atteindre jusqu'à 308 km²,

ce qui est bien plus vaste que celle des ouvrières, qui est de 17,9 km² (Kraus, Wolf, et Moritz 2009). Les ouvrières sont donc plus à risque si leur colonie se trouve à proximité d'une zone polluée en métaux. La durée d'exposition des ouvrières est aussi plus longue que celle des mâles car celles-ci vivent plus longtemps (del Castillo et Fairbairn 2012). Ces différences écologiques entre les castes font qu'il est possible que leur mécanismes de résistance aient évolué de manière différente.

1.4.1.2. Différence de la résistance entre les castes

Chez les abeilles eusociales, la différence de résistance aux métaux entre les mâles et les ouvrières n'a été que très peu étudié. Pourtant certaines études ont démontré qu'il existe une différence de résistance liée au sexe chez certains insectes comme *Drosophila melanogaster* (Balinski et Woodruff 2017) ; (Halmenschelager et da Rocha 2019). Cette résistance pourrait être due au fait que les mâles produisent davantage de métallothionéines que les femelles (Egli et al. 2006). Ce phénomène qui pourrait être expliqué par le fait que la régulation de ces protéines est influencée par des variants du chromosome X (Shirley et Sibly 1999). Certains transporteurs d'ion métalliques sont aussi impactés par le chromosome X (Christie, Williams, et Jacobson 1985). À partir de ces observations, il est possible d'émettre l'hypothèse que, chez les insectes, la résistance et l'homéostasie des métaux seraient influencées par le sexe, ce qui suggère une dépendance à la ploïdie (Balinski et Woodruff 2017).

Comme les abeilles eusociales possèdent un système haplo-diploïde, il est vraiment intéressant de s'attarder sur leur résistance liée au sexe. Des études menées sur les pesticides ont déjà démontré que les mâles seraient plus sensibles à cause de leur haploïdie (Friedli et al. 2020) car les individus hétérozygotes possèdent un meilleur système de détoxification. Un individu hétérozygote peut posséder deux allèles codant pour un même gène de résistance ce qui améliore l'efficacité du système de détoxification et crée des phénomènes de codominances (Carrière 2003 ; O'Donnell et Beshers 2004).

1.4.2. Effet sur le développement

1.4.2.1. Voies d'exposition des larves

Même si les abeilles principalement exposées aux métaux sont celles qui butinent, il est également possible que ces éléments entrent en contact direct avec les larves, ce qui représente un risque pour leur développement. Chez les bourdons sociaux, il existe deux principales voies de contamination : cutanée et orale. L'exposition cutanée se fait au travers de la présence de métaux dans l'environnement, notamment

dans les sols car les colonies de bourdons peuvent être installées dans des terriers de rongeurs abandonnés, des bûches creuses, des tas de pierres ou une végétation dense au sol, l'utilisation des éléments extérieurs pour former la colonie peut donc mener à une exposition des larves (Gradish et al. 2019 ; Feldhaar et Otti 2020). Une autre source d'exposition cutanée des larves est la présence de métaux dans la cire des colonies (Formicki et al. 2013). Les bourdons produisent de la cire dans leur colonie afin d'y stocker leurs œufs, le pollen et le nectar (Gradish et al. 2019) et cette cire est produite à partir du nectar, du pollen et des glandes cirières des ouvrières (Hepburn 1986 ; Rottler, Schulz, et Ayasse 2013). C'est donc par le pollen utilisé pour créer la cire et le stockage des aliments que les métaux peuvent s'introduire dedans et contaminer les larves. Mais la contamination qui reste la plus répandue s'effectue par l'alimentation que les ouvrières donnent aux larves. Cette solution de nutrition est composée d'un mélange de pollen, de nectar et de sécrétion glandulaire (Pereboom 2000 ; Carnell, Hulse, et Hughes 2020). La nourriture des larves peut donc être contaminée par des métaux au travers du nectar et du pollen contaminés et collectés par les ouvrières (**Figure 5**).

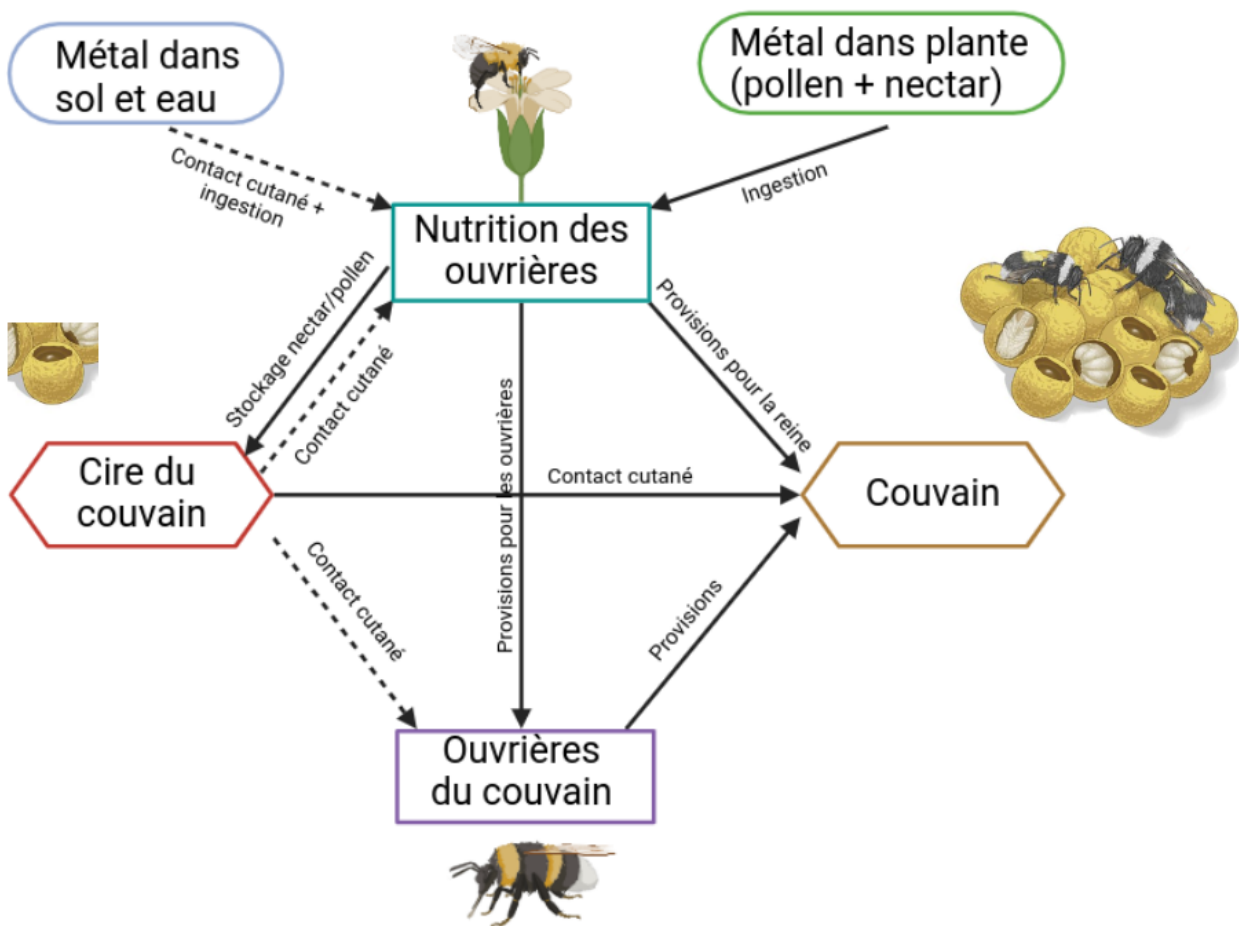


Figure 5. Schéma des voies d'exposition des ouvrières et des larves dans le couvain aux métaux.

Figure réalisé sur Biorender.

1.4.2.2. Effet des métaux sur les larves

Il est intéressant de se pencher sur l'effet des métaux sur les différents stades de développement des abeilles car leur fonctionnement physiologique est différent de celui des adultes. La principale voie de détoxification des métaux des larves se réalise par leur excrétion durant leur défécation qui survient avant la pupaison (Weiss 2006) ; (Scott, Lanno, et Gardiner 2024). Il a été observé chez certaines guêpes sociales que la composition en métaux des fèces des larves était représentatives des concentrations de métaux dans l'environnement et qu'après la défécation, la composition en métaux dans les pupes était plus faible que celle des larves (Urbini, Sparvoli, et Turillazzi 2006), ce qui montre l'efficacité de la détoxification au travers de la défécation. Les larves peuvent aussi absorber les métaux mais comparées aux adultes, leur

accumulation n'est pas un des principaux systèmes de gestion de la toxicité. Les larves peuvent accumuler des métaux dans leurs tissus tels que les corps gras (Krantzberg et Stokes 1990) ou les cellules de l'intestin moyen (Filshie, Poulson, et Waterhouse 1971 ; Ballan-Dufrançais 2002), mais les concentrations en métaux mesurées dans les larves sont supérieures à ceux des pupes (Scott, Lanno, et Gardiner 2024), ce qui montre bien que la plupart des métaux sont excrétés lors de la défécation et que donc l'accumulation n'est pas utile pour leur détoxification. Seul certains types de métaux comme le Cu peuvent s'accumuler dans les tissus des larves (Hladun, Parker, et Trumble 2015 ; Filshie, Poulson, et Waterhouse 1971). Il est aussi possible que les larves produisent des métallothionéines et qu'il serait donc possible de les utiliser pour mesurer le stress métallique (X. Wang et al. 2018).

Comme les larves se révèlent plus sensibles aux métaux que les adultes (Di et al. 2016) il est important d'évaluer leur vulnérabilité. Cette différence de résistance peut être attribuée au fait que les larves ont une capacité réduite de régulation ionique et de défense immunitaire par rapport aux adultes (Ballan-Dufrançais 2002 ; Zhou, Cadigan, et Thiele 2003). De plus, à des concentrations environnementales en métaux, il est observé une augmentation de la mortalité des pupes et une altération de la structure du couvain (Hladun et al. 2015). Même à des concentrations en métaux ou aucun effet n'est observé sur les adultes, les colonies présentent moins de pupes et il est observé une diminution de l'indice de croissance des larves et du poids des pré-pupes et des pupes (Di et al. 2016). Les métaux, chez les diptères, peuvent aussi modifier le temps de développement, impacter la masse des larves et des pupes, créer de la malformation (Shulman, Pakhomov, et Brygadyrenko 2017) et diminuer les chances d'éclosion (Rayms-Keller et al. 1998). Il est donc intéressant de voir si ce type d'effet est aussi observé chez les abeilles. Ainsi, le développement des insectes peut être affecté par la présence de métaux à faible dose, ce qui pourrait menacer le fitness des abeilles et souligner l'importance d'évaluer les risques encourus par les autres stades de développement, et pas seulement celui des adultes.

Objectif

L'objectif de ce mémoire est d'évaluer de manière générale la toxicité de deux métaux que sont le Cu et le Cd sur les bourdons domestiques car ceux-ci n'ont été que peu étudiés dans la littérature. Ces deux métaux ont été choisis afin d'avoir une idée de la toxicité d'un métal essentiel et non-essentiel et l'espèce modèle utilisée est *B. terrestris*. Afin d'évaluer cette toxicité, les organismes ont été exposés par voie orale afin de mesurer la létalité des deux métaux. Les expériences ont été divisées en deux volets : l'un visant à évaluer les effets de ces métaux sur les adultes et l'autre à examiner leurs impacts sur le développement des individus (**Figure 6**).

2.1. Expérience sur les adultes

Durant cette expérience, des ouvrières et des mâles ont été exposés de manière aiguë au deux métaux à différent range de concentration afin, dans un premier temps, d'établir la LC50, la LD50 et la LD50 standardisé avec la masse. Suite au calcul de ces valeurs, la toxicité entre ces deux métaux et entre les ouvrières et les mâles a été comparée. Dans un deuxième temps, différents paramètres chez les ouvrières ont été mesurés afin de caractériser l'effet de ces métaux sur le système digestif, en commençant par la dissection de l'intestin moyen. Le poids avant et après l'expérience et la consommation de sirop de sucre ont aussi été mesuré.

L'exposition orale aiguë individuelle des adultes a été réalisée en suivant le protocole OECD standardisé d'exposition des abeilles adultes ([Brown et al. 2022](#)). L'intérêt d'avoir suivi ce protocole d'exposition est d'évaluer la LD50 qui est une valeur officielle de toxicité permettant d'évaluer la nocivité d'une molécule et de la comparer.

Les questions biologiques qui ont été émises pour cette expérience sont les suivantes :

- **Quel est le niveau de toxicité du Cu et du Cd chez les bourdons sociaux et cette toxicité est-elle la même entre les mâles et les ouvrières ?**
- **Quel impact le Cu et le Cd ont-ils sur l'intestin moyen des ouvrières ?**

2.2. Expérience sur le développement des larves

Pour cette expérience, Les larves de *B. terrestris* ont été mises en incubateur dans des plaques multi-puits afin d'être nourries oralement de manière chronique avec une solution contrôle et contenant du Cu. Pour

cette expérience, ce qui est principalement mesuré est la mortalité au 3 stades de développement que sont les larves, les pré-pupes et les pupes. Mais d'autres paramètres ont aussi été évalués tel le temps des stades de développement, la croissance des larves et le poids après émergence. Le but principal de cette expérience est de voir si, à une concentration environnementale, donc assez faible, il est possible de voir des effets sur le développement de *B. terrestris*.

La question biologique qui a été émise pour cette expérience est la suivante :

- **La concentration environnementale de Cu peut-elle perturber le développement et la mortalité des larves de *B. terrestris* ?**

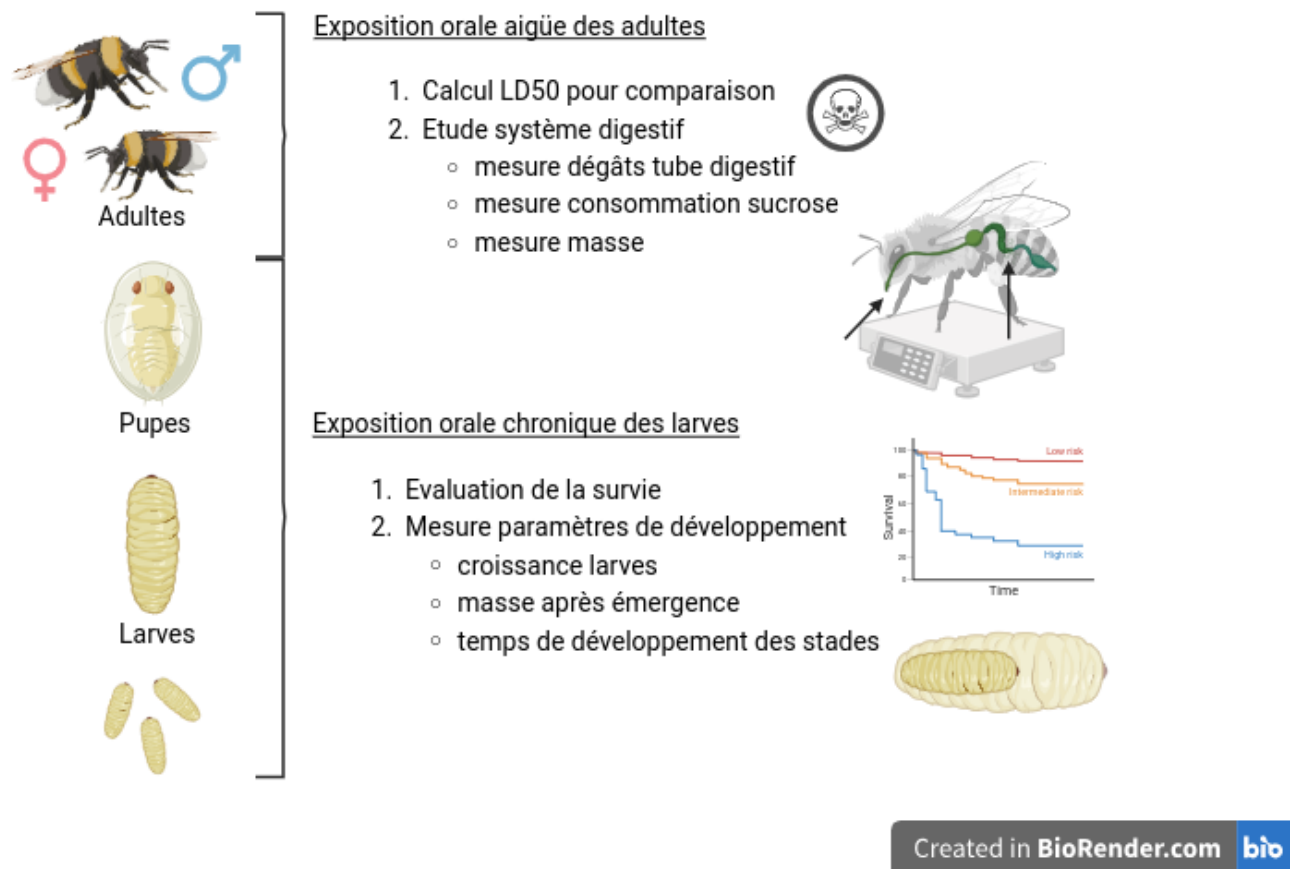


Figure 6. Schéma de la structure des recherches expérimentales de ce mémoire. Figure réalisé sur Biorender.

Matériels et méthodes

3.1. Modèle biologique et xénobiotiques étudiées

3.1.1. Choix de l'espèce modèle

L'espèce modèle qui a été étudiée dans ce mémoire est *Bombus terrestris*, une espèce de bourdons extrêmement prévalente (Hymenoptera : Apidae). Ce bourdon est une espèce eusociale primitive (Rasmont et al. 2008), c'est-à-dire qu'il y a une perte de capacité de reproduction des classes non-reproductive mais que cette perte n'est pas définitive, ce qui est le cas pour les ouvrières de *B. terrestris* qui peuvent encore se reproduire en l'absence de reine (Bloch et Hefetz 1999 ; Darrouzet et Corbara 2016).

Développement et cycle de vie

Pour étudier l'impact que des polluants peuvent avoir sur le fitness de *B. terrestris*, il est important de comprendre son cycle de vie et son développement. Le cycle de vie de *B. terrestris* se divise en deux phases, une phase solitaire où la reine émerge du nid, se reproduit, hiberne et fonde une nouvelle colonie, et une phase sociale durant laquelle la reine produit les ouvrières qui s'occuperont des larves et du maintien de la colonie (L. Wang et al. 2019a). En fin de saison, des mâles et des reines sont produits et la colonie prend fin (Holland et Bourke 2015). Les bourdons subissent trois transformations durant leur développement, une première où l'œuf éclot en larves, une deuxième où les larves passent par quatre stades et se transforment finalement en pupes, et une dernière où les adultes émergent de leur cellule. Les œufs sont pondus dans la colonie sous forme de paquet dans une même cellule ; ils éclosent ensemble et sont nourris régulièrement par les ouvrières. Après avoir atteint une certaine taille, les larves s'isolent dans des cellules individuelles et sont nourries jusqu'à défécation. Après la défécation, les larves entament le début de leur métamorphose pour devenir une pupes et une fois cette transformation terminée, les adultes formés émergent de leur cellule (Van den Toorn et Pereboom 1996 ; Cnaani, Schmid-Hempel, et Schmidt 2002 ; Amsalem et al. 2015 ; Tian et Hines 2018).

*Intérêts d'utiliser *B. terrestris**

En écotoxicologie, les modèles d'études généralement utilisés sont les crustacés et les poissons, mais les insectes peuvent aussi être utilisés. Parmi celles-ci, l'une d'elle est particulièrement étudiée pour les abeilles qui est *Apis mellifera* ([Lyubenova et al. 2016](#)). Mais ce choix n'est pas forcément pertinent pour évaluer la

vulnérabilité des abeilles car sa résistance à plusieurs xénobiotiques est plus élevée que celle d'autres espèces (Van der Steen et al. 2012) ; (Arena et Sgolastra 2014). Le choix d'une espèce domestiquée comme modèle est souvent lié à sa disponibilité qui permet d'obtenir un plus grand nombre de réplicats, un critère important à prendre en compte lors de bioessais. Une alternative à *A. mellifera* est *B. terrestris* (Brown et al. 2022). Afin d'étudier l'impact des métaux sur les différents stades de développement de *B. terrestris*, les stades de larves (2-3), pré-pupes (4), pupes (5) et adultes (6-7) illustrés sur la **figure 7** ont été étudiés

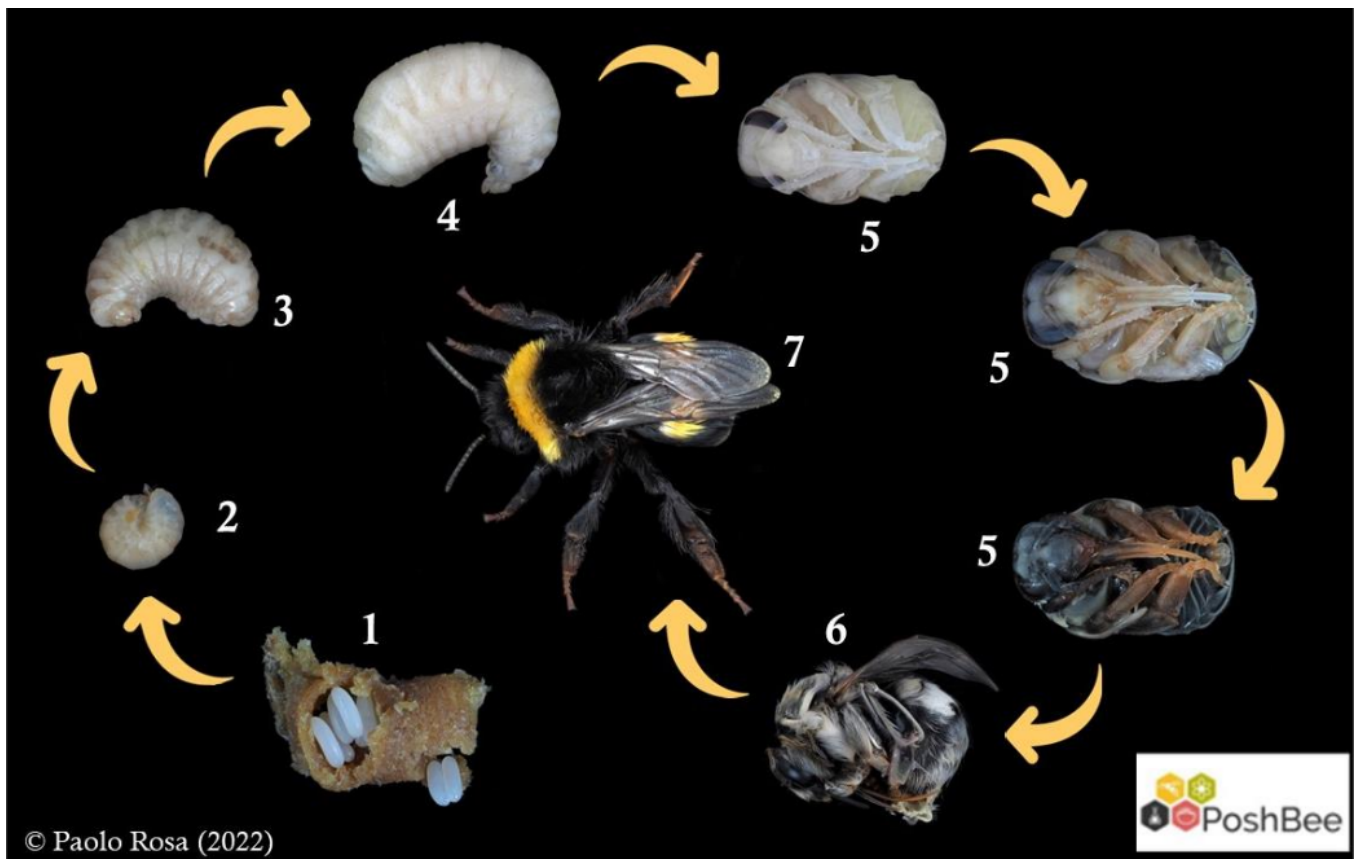


Figure 7. Montage photo représentant les différents stades de développement de *Bombus terrestris*. 1 : œuf pondu en paquet, 2 : larves en groupe, 3 : larve isolée, 4 : larve après défécation (pré-pupe), 5 : développement de la pupa, 6 : adulte non émergé, 7 : adulte émergé. Photo réalisée dans le laboratoire de zoologie à l'UMons par Paolo Rosa.

3.1.2. Choix des métaux étudié

Comme expliqué précédemment, les métaux peuvent être classés en fonction de leur intérêt biologique, ce qui les divise en deux catégories, les essentiels et les non-essentiels. Dans ce mémoire, afin d'étudier l'effet de ces deux types de métaux, nous avons utilisé le Cu, un métal essentiel et le Cd, un métal non-essentiel.

Les origines anthropiques du Cd proviennent de la combustion d'énergies fossiles solide, de l'incinération de déchets, de la sidérurgie, de la métallurgie et de la production de piles alcalines. Les zones contaminées par ce métal sont principalement les zones industrielles et les déchetteries centralisées (Jaishankar et al. 2014 ; Cuniasse et Glass 2020). Il peut aussi être présent dans les zones agricoles, étant utilisé dans les engrais riches en phosphates (Goff et Bonnomet 2004). Le Cu, quant à lui, provient de l'usure des plaquettes de frein, de l'abrasion des routes, de l'usure des caténaires ferroviaires, de la combustion de minéraux, du carburant et de la métallurgie (Cuniasse et Glass 2020). Il est aussi présent dans les zones agricoles notamment par l'utilisation de la bouillie bordelaise utilisée dans les vignobles et certains fongicides (Le Bouil et al. 2001 ; Darriet et al. 2001 ; Goff et Bonnomet 2004). Ces deux métaux sont bioaccumulables et bioamplifiables dans la chaîne alimentaire, d'où leur pertinence en écotoxicologie (Butt et al. 2018 ; Mann, Vijver, et Peijnenburg 2011).

3.2. Exposition des adultes au Cu et au Cd

3.2.1. Exposition des ouvrières

Description du protocole OECD No. 247 2017

Afin d'évaluer la toxicité du Cu et du Cd, un protocole standard d'exposition orale aiguë sur les bourdons adultes (OECD 2024), revisité par l'équipe Poshbee (Brown et al. 2022), a été utilisé. Ce protocole consiste à inoculer aux bourdons un faible volume de solution contaminée avec le polluant d'intérêt et ensuite d'observer la mortalité des individus pendant 96 h, ceux-ci étant alors nourris de solution sucrée. Cinq concentrations avec un gradient géométrique ont été utilisées afin d'évaluer, *in fine*, la concentration létale 50% (LC50) du polluant d'intérêt pour l'organisme étudié. Ici, les organismes étudiés sont des bourdons de l'espèce domestiquée *Bombus terrestris* venant de colonies commandées à l'entreprise Biobest© (Westerlo, Belgique). Ces colonies se trouvent dans des boîtes en cartons munies de système de ventilation et d'un système d'alimentation sans entretien contenant du Biogluc® (Wäckers et al. 2017).

Des boules de pollen de saule (« Ruchers de Lorraine », France) mélangé à de l'eau de SPA© ont été déposées dans les boîtes de colonies de manière continue afin d'augmenter la production d'ouvrières dans la colonie (pollen:eau 10:4 w/w) (Vanderplanck et al. 2014).

Pour les expositions individuelles, les ouvrières ont été isolées dans des cages Nicot© trouées et bouchées par une seringue de 2 ml. Après cette isolation, les ouvrières ont été pesées vivantes dans leur cage Nicot© et la valeur obtenue a été conservée pour réaliser la mesure de la masse initiale. Pour cette expérience, deux types de seringues ont été utilisés : les seringues de nutrition sans embout pour les volumes importants et les seringues d'exposition avec embout pour les faibles volumes. Dans un premier temps, afin d'habituer les ouvrières à la cage, celles-ci sont nourries avec du sirop de sucrose 50% (eau:sucrose 1:1 w/w) pendant 24h. Les ouvrières mortes durant ce laps de temps sont remplacées (**Figure 8**). Dans un deuxième temps, les ouvrières sont exposées aux différentes concentrations de métaux (**Table 1**) via une goutte de 40µL de sucrose contenant la quantité de métal adéquate. Pour cette exposition, la prise de nourritures des ouvrières a été contrôlée durant maximum 4h et une fois les 40 µL consommés, la survie de l'ouvrière est relevée toutes les 24 h durant 96 h (i.e. 24, 48, 72 et 96 h après exposition). Durant ces 96 h, les ouvrières sont nourries avec du sirop de sucrose *ad libitum*. La consommation a été mesurée chaque jour, c'est-à-dire que les seringues de sucrose 50% ont été pesées et remplacées toutes les 24 h. Les ouvrières mortes au cours de l'expérience sont pesées et préservées à -70°C pour les analyses de tube digestif (*vide infra*). Afin de mesurer la masse initiale, les cages Nicot© à vide des ouvrières mortes sont pesées et cette masse est déduite de celle des ouvrières vivantes dans leur cage (masse ouvrière et cage – masse cage = masse initiale). Les survivantes après 96 h sont également pesées et ensuite congelées à -70°C. Les masses ont été mesurées avec une balance précise à 10⁻³ g.

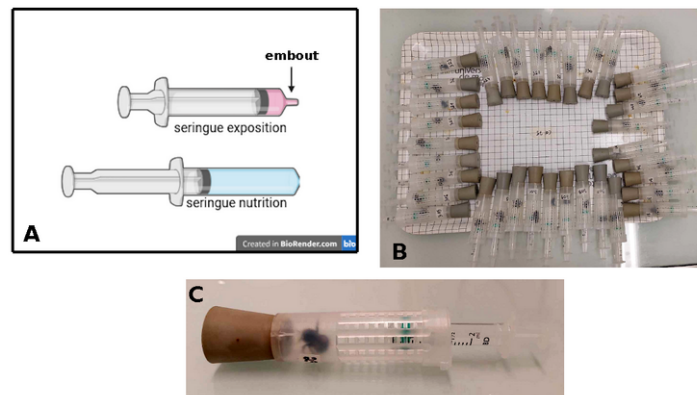


Figure 8. Expositions individuelles des adultes au Cu et au Cd. A : Schéma des différentes seringues utilisées pour les expositions, rouge = inoculum, bleu = sirop de sucre 50%. B : Plateau contenant un traitement complet. C : Cage Nicot avec une seringue utilisée pour les expositions. La seringue est introduite par un trou percé directement dans la cage. Image réalisée sur gimp.

Table 1. Concentrations utilisées lors de l'expérience principale pour le calcul de la LC50/LD50/LD50 . Ces concentrations sont les valeurs mesurées par l'ICP-OES à la plateforme MOCA. Les métaux ont été dissous dans du sirop de sucre 50%.

Ouvrières		Mâles	
Cd (mg/L)	Cu (mg/L)	Cd (mg/L)	Cu (mg/L)
9	96	20	55
19	202	42	113
30	397	82	231
68	876	170	500
130	1618	410	1182

Les ouvrières isolées ont été placées dans une salle d'élevage munie de lumière rouge et maintenues à une température et une humidité de 27 +/- 1 °C et 60 +/- 10 % RH. Aucune photopériode n'a été simulée, c'est dans cette salle que la mortalité a été mesurée. La lumière rouge permet la manipulation des bourdons car ceux-ci n'ont pas la capacité de voir la lumière spectrale rouge (Skorupski, Döring, et Chittka 2007).

Réalisation des solutions

Le protocole OECD 2017 n'ayant jamais été utilisé pour établir la LC50 du Cu et du Cd chez aucune espèce de bourdons, il fut nécessaire de conduire une expérience pilote afin d'estimer les concentrations avec gradient géométrique à utiliser pour l'expérience principale. Pour se faire, par essai erreur, des ouvrières furent exposées à différentes concentrations de Cu et de Cd, en se basant notamment sur une extrapolation d'effets létaux déjà reportés dans la littérature. Ainsi, un total de 10 concentrations de Cd et 9 concentrations de Cu ont été testées au travers de deux tests différents (**Table 2**), chaque concentration testant 9 ouvrières issues de trois colonies différentes (3 ouvrières * 3 colonies = 9). La mortalité des ouvrières après 72 h a été enregistrée. Ces résultats préliminaires nous ont permis de définir les concentrations à utiliser dans l'expérience principale. Le design d'inoculation de l'expérience pilote est identique à celui de l'expérience principale (*vide infra*), mais seule la mortalité a été mesurée.

Table 2. Concentrations utilisées lors de l'expérience pilote et nombre de morts mesuré 72h après exposition. Les métaux ont été dissous dans du sirop de sucre 50%. Les concentrations notées sur ce tableau n'ont pas été analysées en laboratoire et donc la concentration réelle des métaux n'est pas connue. Ces données n'ont donc pas été comparées avec celle de l'expérience principale.

1er test			
Cd (mg/L)	Nbr mort	Cu (mg/L)	Nbr mort
7	0	10	0
20	0	30	1
60	0	90	0
180	9	270	0
540	9	810	1
2e test			
Cd (mg/L)	Nbr mort	Cu (mg/L)	Nbr mort
60	1	810	0
90	7	1620	3
120	9	3240	2
150	9	6480	0
180	9		

Sur base des résultats de l'expérience pilote, cinq concentrations de Cu (CuCl₂; Sigma-Aldrich, CAS 7447-39-4) et cinq concentrations de Cd (CdCl₂; Sigma-Aldrich, CAS 10108-64-2) ont été testées (**Table 1**). Ces solutions furent préparées avec du sirop de sucrose 50% (eau:sucrose 1:1 w/w), qui sert de traitement contrôle (i.e. 0 mg.L⁻¹). Une solution de diméthoate dissoute dans du sirop de sucrose 50% à hauteur de 0.1 mg.mL⁻¹ fut utilisée comme contrôle positif (OECD 2024). Les concentrations en Cu et Cd des solutions furent mesurées par ICP-OES à la plateforme MOCA (Mineral and Organic Chemical Analysis) de Louvain-la-Neuve. Pour chaque traitement, 35 ouvrières de 5 colonies différentes ont été exposées (7 ouvrières * 5 colonies = 35).

3.2.2. Exposition des mâles

Les mâles utilisés dans cette expérience sont issus de Masculino-Systems commandés à l'entreprise Biobest© Westerlo, Belgique). Ce système est une boîte possédant une aération et contenant 50 mâles de *B. terrestris* nourris par des bandes de biogluc© (Wäckers et al. 2017). Le système d'exposition pour les mâles est le même que celui utilisé pour les ouvrières décrit plus haut, à la différence que l'expérience pilote n'a pas été réalisée et que leur consommation de sirop de sucrose 50% n'a pas été mesurée. Les concentrations utilisées pour les traitements des mâles sont représentées sur la **Table 1** avec la réalisation d'un contrôle négatif et un contrôle positif identique à ceux des ouvrières. Le nombre de traitements pour les mâles est donc de 12. Par contre, le nombre de réplicats est inférieur à celui des ouvrières, à savoir que 20 mâles provenant de 10 Masculino-System ont été utilisés par traitement (2 mâles * 10 Masculino-System = 20).

3.2.3. Dissection des tubes digestifs

Afin d'étudier les dégâts causés par l'exposition aux métaux au niveau du tube digestif, les ouvrières sont sorties du congélateur -70°C, transportées sur glace et disséquées sous binoculaire. Les individus sont épinglés sur une plaque de cire blanche, l'abdomen est ouvert ventralement, et les viscères sont immergés dans 50 µL de solution de Ringer afin de faciliter la manipulation et d'empêcher la dessiccation. Le tube digestif est isolé sur une plaque de cire blanche propre, les tubes de Malpighi sont retirés et le mésentéron est photographié au Keyence VHX-970F (luminosité manuelle 13.25, grossissement 50x) (**Figure 9**). Les images sont par la suite ouvertes dans le logiciel Fiji afin de déterminer le degré de mélanisation au niveau de l'intestin moyen (0 = noir ; 255 = blanc). Ces valeurs sont ensuite retravaillées (255 – valeur) afin d'obtenir le « degré de noirceur » de l'intestin moyen.

Afin de s'assurer que les dégâts observés sur le tube digestif sont bien issus de l'exposition aux métaux et non d'une décomposition apparue entre le moment de la mort et la mise au congélateur, une expérience post-hoc a été réalisée. Durant cette expérience, 9 ouvrières ont été congelées vivantes à -70 °C et 9 autres ouvrières ont été décapitées et laissées 24h dans la salle d'élevage avant d'être congelées à -70 °C. Leur tube digestif a ensuite été disséqué et analysé comme pour les ouvrières traitées. Nous avons ainsi montré que la mélanisation du tube digestif n'était pas due à la décomposition post-mortem.

3.3. Exposition des larves au Cu et au Cd

Cette expérience se base sur l'expérience réalisée par Kato et al. (2022) qui a développé une technique permettant de tester l'effet de xénobiotiques sur le développement larvaire de bourdons. Les colonies de *Bombus terrestris* utilisées pour cette expérience proviennent de l'entreprise Biobest© (Westerlo, Belgique). Afin d'accroître au maximum le nombre de larves présentes au sein de ces colonies, ces dernières ont été nourries pendant deux semaines avec du Biogluc® et des pelotes de pollen (pollen:eau 10:4 w/w) *ad libitum*.

3.3.1. Mise en plaque des larves

Les plaques multi-puits qui contenaient les larves durant tout le long de leur développement (**Figure 10**) sont des plaques de 24 puits. Dans ces puits, a été coulée de la cire claire d'abeille naturelle afin de mimer au mieux l'environnement du nid.

Les colonies ont été vidées de leurs ouvrières et disséquées afin de prélever les larves et de les mettre dans les plaques multi-puits. Les larves qui ont été récoltées étaient si possible déjà isolées des autres larves. Chaque puit contenait une seule larve et au total 25 plaques ont été réalisées, pour un total de 552 larves. Afin d'avoir un échantillon aléatoire, chaque plaque représentait un mélange de larves provenant de 4 à 5 colonies différentes. Toute la mise en plaque a été réalisée le même jour.

Une fois les larves mises dans les plaques, celles-ci ont été placées dans un incubateur à 34 °C avec une humidité de 75% RH et plongées dans le noir. Durant le premier jour, afin de permettre aux larves de s'acclimater, celles-ci ont été nourries avec de la nourriture non traitée et les mortes (pour cause de la mise en plaque) ont été retirées de l'expérience.

3.3.2. Préparation de la nourriture et des traitements

Deux traitements différents ont été administrés aux larves, à savoir un traitement au Cu et un contrôle négatif sans métaux. Pour la formation de la solution contrôle, du pollen de saule (*Salix sp.*) en poudre a été mélangé à de l'extrait de levure, de la caséine de sodium et du sirop de sucrose 50% avec respectivement un ratio de masse de 0,4:0,1:0,01:1 (Kato et al. 2022). Le tout a ensuite été soniqué pour homogénéisation. La caséine de sodium permet un apport en acide aminé essentiel ; cet apport est essentiel dans l'alimentation des bourdons pour une croissance optimale (Stabler et al. 2015). L'apport en levure permet de simuler les conditions naturelles d'alimentation des larves et d'améliorer leur développement, pouvant agir comme des probiotiques (Pozo et al. 2020).

Pour la réalisation des traitements, du Cu (CuCl_2 ; Sigma-Aldrich, CAS 10108-64-2) a été homogénéisé et dissous dans la solution contrôle. La teneur en métaux des traitements (contrôle et Cu) a été analysée par le laboratoire Agro-Bio Tech de Gembloux (B.E.A.Gx) ; cette valeur a été mesurée à 11,9 mg/L pour le traitement au Cu, valeur inspirée de la moyenne environnementale trouvée par l'équipe PoshBee (~9 mg/L ; (Durkalec, 2024)

3.3.3. Nourrissage et paramètres mesurés

Les larves sont nourries tous les jours à 8 - 13 - 18h jusqu'à leur défécation. Pour le nourrissage, une goutte de 6 μl de leur traitement est déposée sur leur abdomen à la micropipette. Chaque larve est nourrie individuellement. Lorsqu'une larve meurt, celle-ci est retirée du puits. Les puits présentant de la moisissure (**Figure 10 F**) ont été retirés de l'expérience.

Afin de simplifier la mesure du développement des bourdons, celui-ci a été divisé en 4 stades que sont le stade larvaire durant lequel les larves sont nourries, le stade de pré-pupe durant lequel la larve a déféqué et n'est plus nourrie, le stade de puppe où la morphologie nymphale est bien marquée, et le stade adulte où l'organisme est correctement formé avec ses ailes et ses poils (**Figure 7**).

Les différents paramètres mesurés durant cette expérience sont la date de défécation, la date de début de pupation, la date d'émergence, l'aire de la larve au 1er et 6e jour d'expérience, le poids de l'adulte après émergence et l'éventuelle date de décès. La mesure de la croissance de la larve est réalisée à partir de la

comparaison de la mesure de l'aire de la larve au J1 et au J6. Les larves mesurées sont celles qui n'ont pas encore déféqué. L'aire de la larve est mesurée au Keyence© VHX-970F.

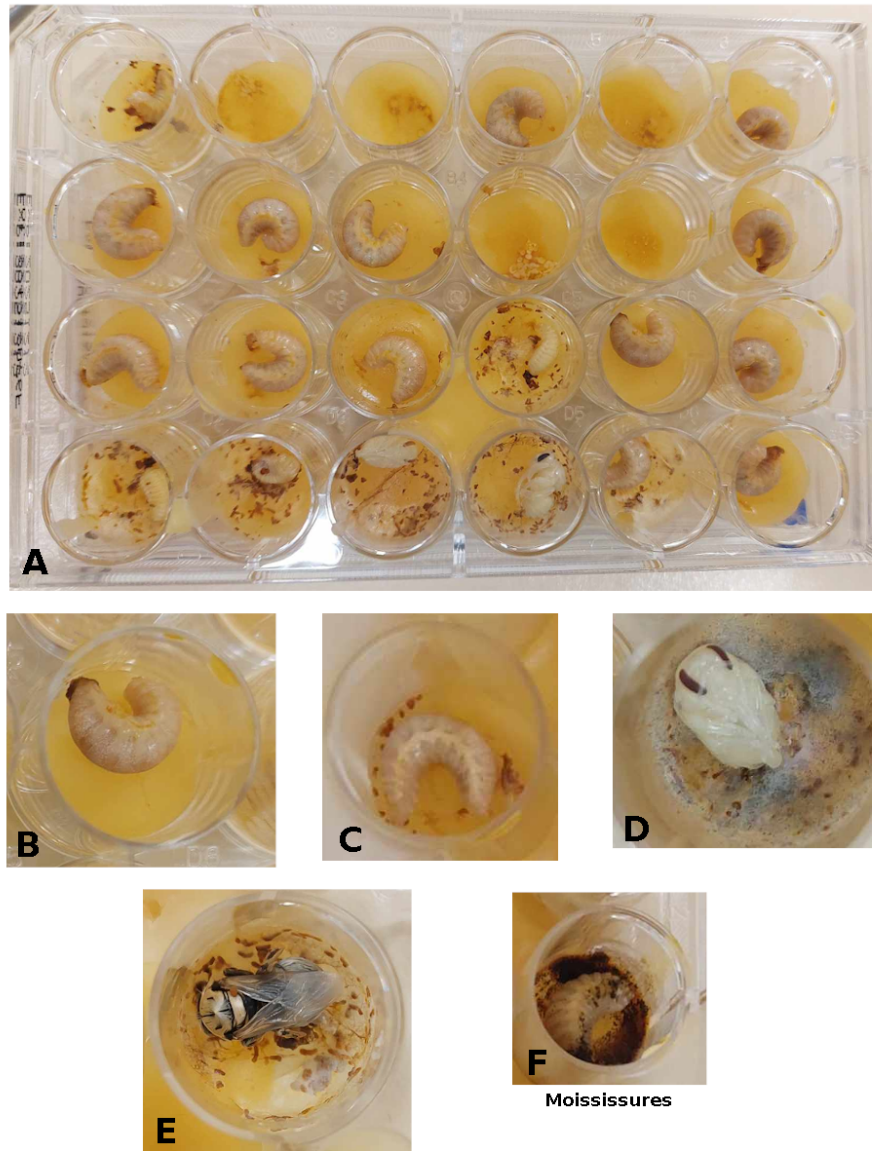


Figure 10. Illustration du développement de *B. terrestris* in vitro A : Photo globale d'une plaque de 24 puits remplie de cire d'abeille naturelle et dans lesquelles sont placés des individus en cours de développement. Les puits vides sont les puits pour lesquels les individus sont morts. B : Larve pré-défécation. C : Larve post-défécation (pré-pupe). D : Puppe. E : Adulte émergé. F : Puits contaminé par de la moisissure. Image réalisée sur Gimp.

3.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R studio© v. 4.4.0 (R Core Team 2024) et la significativité est mesurée par la valeur P à un seuil alpha de 0,05 obtenu au travers de différents tests. Les graphiques sont réalisés avec le package “ggplot2” sauf indication contraire.

3.4.1. Exposition des adultes

Détermination de la toxicité du Cu et du Cd

L'évaluation de la toxicité du Cu et du Cd en fonction des sexes a été réalisée avec le modèle dose-réponse (DRC). Ce modèle permet de calculer la dose effective (ED50) qui est la dose se trouvant à 50% de la réponse étudiée qui est pour nous la mortalité ; c'est de cette valeur que découle le calcul de la LC50 et de la LD50 (Ritz et al. 2015). Comme la réponse étudiée est la mortalité des ouvrières, les données utilisées sont des données binomiales, avec une valeur de 0 pour vivant et une valeur de 1 pour mort. Les fonctions permettant la réalisation des courbes dose-réponse sont les fonctions `drm()` et `LL.3()` du package “drc”.

La LC50, LD50 et LD50 standardisée par la masse (LD50 std) ont été calculées pour chaque sexe et chaque métal. Ces valeurs n'ont pas pu être calculées pour les mâles traités au Cu car ceux-ci ont refusé d'ingérer le Cu à fortes concentrations (concentration $C_{max} = 500$ mg/L). Pour le Cd, les valeurs de toxicité ont pu être calculées pour les deux sexes. Nous avons cherché à répondre à la question biologique est la suivante : « la toxicité du Cd est-elle différente entre les ouvrières et les mâles ? ». Cette hypothèse a été testée pour la courbe dose-réponse de la LD50 et la LD50 std. Un dernier test d'hypothèse pour évaluer la différence entre la toxicité du Cu et du Cd a aussi été réalisé et la question biologique suivante : la toxicité du Cd est-elle la même que celle du Cu ? ». Les fonctions utilisées pour ces tests d'hypothèses sont `LL.4()` et `compParm()` du package “drc”.

Effet des métaux sur la survie des ouvrières

La courbe de survie permet de déterminer la probabilité qu'un individu survive jusqu'à un moment t , cette fonction étant illustrée par la courbe de Kaplan-Meier ; les comparaisons entre les différentes courbes sont réalisées à partir d'une régression de Cox (Mantel-Cox) (Therneau 2024).

La courbe de survie des ouvrières pour chaque traitement au Cu et au Cd pendant 96 h (survie mesurée toutes les 24 h) a été réalisée avec la fonction `survfit()` du package “survival”. Le test d'hypothèse auquel

nous avons cherché à répondre est le suivant : “Les courbes de survie des traitements au métaux sont-elles différentes de la courbe de survie du groupe contrôle ?”. Cette hypothèse a été calculée à l’aide d’une régression de Cox avec la fonction `survdiff()` du package “survival” ; les effets aléatoires qui ont été pris en compte sont la masse et les colonies et l’effet fixe représente les traitements. Après cette comparaison, nous avons constaté une différence dans la toxicocinétique du Cu et du Cd pour les deux concentrations les plus élevées. Ces deux courbes ont donc été comparées avec comme test d’hypothèse “La dynamique de survie des ouvrières traitées à 1618 mg/L de Cu est-t-elle différente de celle des ouvrières traitées à 130 mg/L de Cd ?”. Le test utilisé pour cette comparaison est une régression de Cox réalisée à partir de la fonction `coxph()`. Les données utilisées pour la réalisation des courbes de survie proviennent de deux types de variables, une variable binomiale avec une valeur de 0 pour vivant et une valeur de 1 pour mort, et une variable de temps en heures.

Effet des métaux sur la le tube digestif des ouvrières

Les analyses des dégâts intestinaux, de la perte de masse des ouvrières ainsi que la consommation de sucrose pendant 24 h des ouvrières (standardisée par leur masse) en fonction des différents traitements ont été réalisées de la même manière. Dans un premier temps, un test de Shapiro avec la fonction `shapiro.test()` a été réalisé afin de déterminer la normalité des données. Puisque la normalité n’était pas respectée, nous avons opté pour des tests non-paramétriques. Pour la consommation de sucrose, le test d’hypothèse qui a été émis est le suivant : “La consommation de sucrose 24 h après l’administration du traitement est-elle différente entre les différents traitements ?” et le test statistique qui a été utilisé est un test de Kruskal-Wallis réalisé par la fonction `kruskal.test()`. Pour la masse des ouvrières, une comparaison entre les différents métaux d’un même traitement a été réalisée avec comme test d’hypothèse “ La masse des ouvrières est-elle différente entre les traitements pour un même métal ?”. Le test statistique qui a été utilisé est aussi un test de Kruskal-Wallis réalisé par la fonction `kruskal.test()`. Par la suite un test post-hoc de Dunn avec la fonction `dunnTest()` du package “FSA” a été réalisé pour comparer les concentrations entre elles (thomash 2014 ; Midway et al. 2020).

Pour les dégâts intestinaux, comme le paramètre mesuré est la noirceur du tube digestif qui représente la réponse de mélanisation, nous avons émis le test d’hypothèse suivant “Les différents traitements ont-ils eu un effet sur la réponse de mélanisation ?”. Le test statistique qui a été utilisé est aussi un test de Kruskal-Wallis. Une fois les tests réalisés, les traitements qui étaient différents ont été comparés un à un par un test post-hoc de Dunn avec la fonction `dunnTest()` du package “FSA”. Par la suite, une comparaison entre la

noirceur du tube digestif des plus hautes concentrations en Cu et en Cd ont été comparé avec comme test d'hypothèse "la noirceur du tube digestif du Cu à 1618 mg/L est-elle différente de la noirceur du tube digestif du Cd à 130 mg/L ?". Pour ce faire, un test de Kruskal-Wallis avec la fonction `kruskal.test()` a été utilisé.

3.4.2 Exposition des larves

Effet des métaux sur la survie des larves durant leur développement

Dans un premier temps, nous avons réalisé la courbe de survie globale pour le traitement au Cu et le groupe contrôle ; ces deux courbes de survie ont ensuite été comparées et nous avons essayé de répondre au test d'hypothèse suivant : "La survie des individus traités au Cu durant tout leur développement est-t-elle différente que la survie des larves non traitées ?". Dans un second temps, nous avons tracé les courbes de survie pour chaque stade distinct, à savoir les larves, les pré-pupes et les pupes. Comme pour l'analyse de la survie globale, nous avons effectué un test statistique afin de comparer la courbe de survie du traitement au Cu avec celle du groupe contrôle pour chacun de ces stades. Nous avons essayé de répondre à trois tests d'hypothèses que sont : "la survie des larves/pré-pupes/pupes est-elle différente de la survie du groupe contrôle ?" Le test statistique, comme pour la survie des ouvrières, a été réalisé par une régression de Cox avec la fonction `coxph()`, la taille et la colonie de provenance ont été pris en compte dans le code, et les courbes de survie ont été réalisées avec la fonction `survfit()` du package "survival".

Effet des métaux sur le développement

L'évaluation de l'impact du Cu sur le développement a été divisée en deux analyses différentes. La première est la comparaison de la croissance des larves et de la masse des adultes en fonction des traitements (Cu et contrôle). La deuxième analyse est la comparaison du taux de développement en fonction des traitements, le taux de développement représentant le nombre d'individus ayant atteint trois événements clés du développement que sont la défécation, la pupaison et l'émergence.

Pour la comparaison de la croissance et de la masse, les deux tests d'hypothèses qui ont été émis sont "La croissance des larves entre le 1er et le 6e jours est-elle différente entre les larves nourries avec et sans Cu" et "La masse à l'émergence est-elle différente entre les larves traitées et non traitées au Cu ?". Pour ce faire, nous avons tout d'abord réalisé un test de Shapiro (`shapiro.test()`) afin de s'assurer que les données étaient bien non-normales. Nous avons ensuite réalisé un test de Mann-Whitney-Wilcoxon U pour voir s'il existait

une différence dans la distribution des données en fonction des traitements. Le test de Mann-Whitney-Wilcoxon U est un test réalisé pour évaluer la différence dans la distribution des données lorsque celles-ci ne suivent pas la loi normale (Midway et al. 2020). La fonction utilisée pour réaliser ce test est `wilcox.test()`.

Enfin, nous avons voulu voir si le temps de développement de chaque stade a été impacté par le traitement au Cu. Pour ce faire, nous avons essayé de répondre à trois tests d'hypothèses que sont : “ Le temps de développement des larves/des pré-pupes/des pupes est-il différent entre le traitement au Cu et le groupe contrôle ?”. Pour ce faire, nous avons d’abord évalué la normalité des données par un test de Shapiro (`shapiro.test()`) pour s’assurer que les données étaient bien non-normales. Nous avons ensuite réalisé un test de Mann-Whitney-Wilcoxon U avec la fonction `wilcox.test()` pour évaluer si la distribution des données était bien différente en fonction des traitements.

Résultats

4.1. Exposition aiguë des adultes au Cu et au Cd

4.1.1 Détermination de la toxicité

Comparaison de la toxicité du Cu et du Cd

Le degré de toxicité du cuivre et du cadmium a été comparé dans le but de déterminer quel métal est le plus toxique. Les indices de toxicité (LC50, LD50 et LD50 std) pour les 4 groupes (mâles/ouvrières, Cd/Cu) sont représentés sur la **Table 3** et les différentes courbes réponses-doses sur les **figures 11 et 12**. Pour les ouvrières, la LC50 du Cu est 19 fois plus élevée que celle du Cd (DRC, $p < 0,001$), étant respectivement de 788 mg/L de sucrose et 41 mg/L de sucrose, cette comparaison est aussi valable pour la LD50 qui est 19 fois plus toxique (DRC, $p < 0,001$). Cette différence de toxicité est moins marquée lorsqu'on regarde la LD50 std qui n'est que de 15 fois plus toxique pour le Cd avec une valeur de 110 mg/g.bourdons de sucrose pour le Cu et de 6,88 mg/g.bourdons pour le Cd (DRC, $p < 0,001$).

Table 3. Valeurs de toxicités de l'exposition des ouvrières et des mâles au Cu et au Cd. Toutes les valeurs de toxicité ont été calculées avec la "dose response model" du package "drc" du logiciel R. Les significativités individuelles ont été calculées par une "General Linear Hypotheses" et les significativité de comparaison ont été calculées avec la fonction compParm(). Le seuil alpha est fixé à 0,05.s

	Cu		Cd	
	Ouvrière	Male	Ouvrière	Male
LD50 std	110,4942	389,5265	6,8827	8,0425
p value	<1e-10***	0,498	<1e-10***	<1e-10***
p value comp	0,7722		0,2693	
LD50	31,5426	172,9935	1,6398	2,926
p value	<1e-10***	0,5826	<1e-10***	<1e-10***
p value comp	0,197		<1e-10***	
LC50	788,5643	4324,8383	40,9959	73,153
p value	<1e-10***	0,5826	<1e-10***	<1e-10***

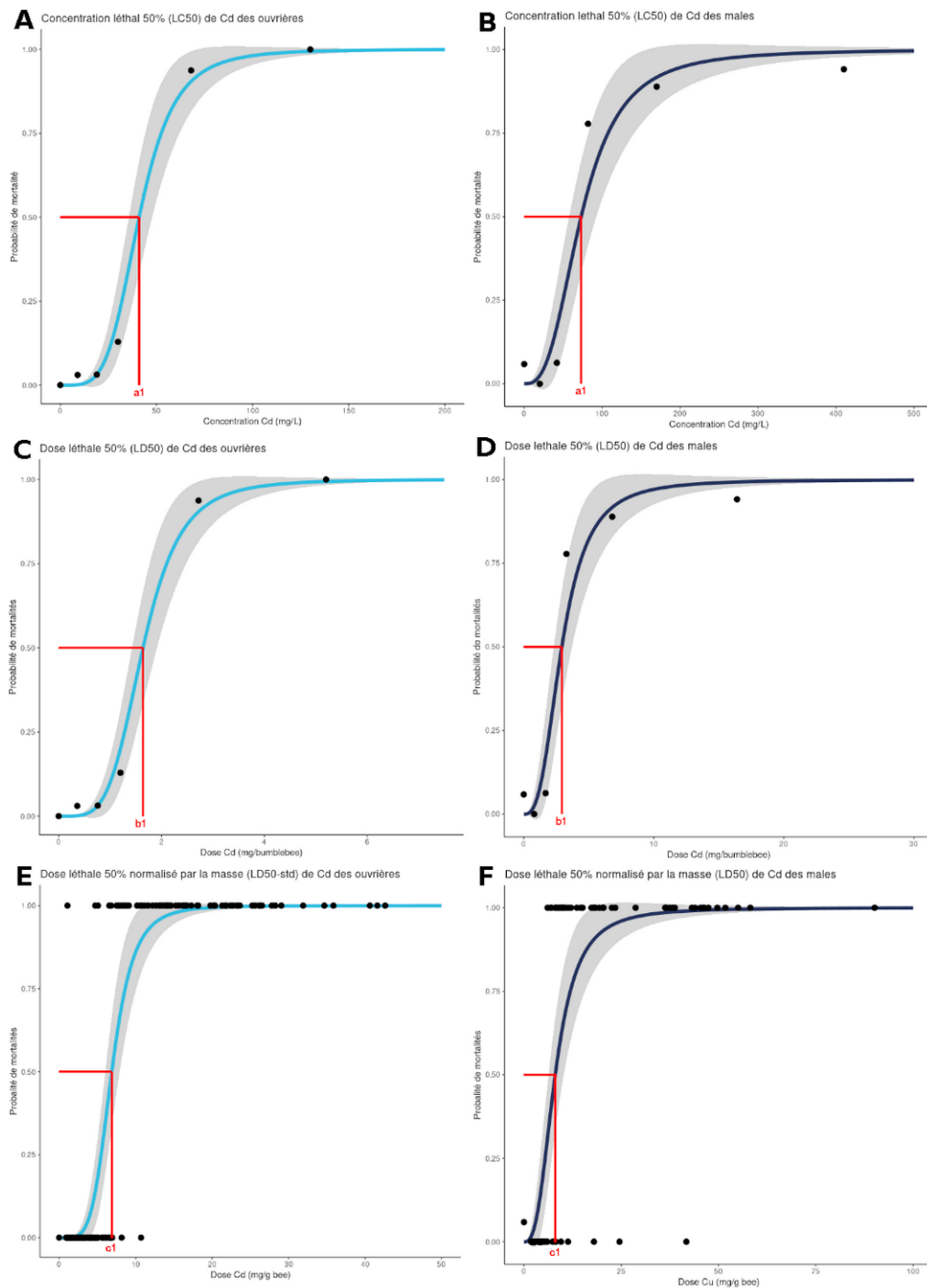


Figure 11. Représentation des courbes doses/réponses pour le calcul de la LC50, de la LD50 et de la LD50std du traitement au Cd pour les ouvrières (bleu clair) et les mâles (bleu foncé). a1 = LC50, b1 = LD50, c1 = LD50 std. Les valeurs de toxicité mesurées sont représentées sur la Table 3.

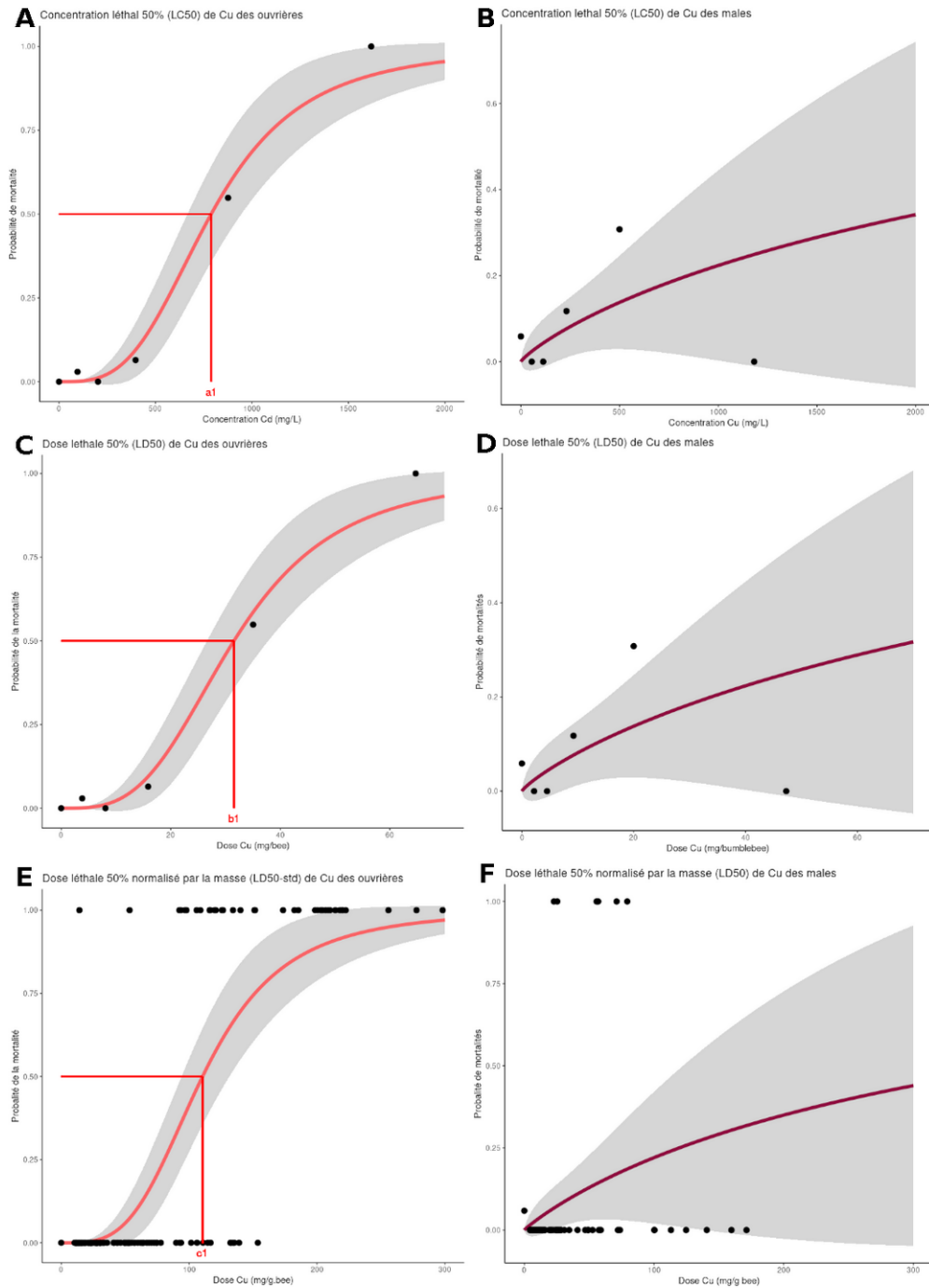


Figure 12. Représentation des courbes doses/réponses pour le calcul de la LC50, de la LD50 et de la LD50std du traitement au Cu pour les ouvrières (rose clair) et les mâles (rose foncé). Le calcul de ces valeurs de toxicité pour les mâles n'a pas pu être effectué à cause d'un refus d'ingérer la dose. $a1 = LC50$, $b1 = LD50$, $c1 = LD50\ std$. Les valeurs de toxicité mesurées sont représentées sur la Table 3.

Comparaison de la toxicité du Cd entre les mâles et les ouvrières

Pour déterminer si la résistance au Cd diffère entre les ouvrières et les mâles, une comparaison de la LD50 a été effectuée et nous avons observé une différence de résistance au Cd entre les ouvrières et les mâles (DRC, $p < 0,001$). La LD50 des mâles a été calculée à 2,93 mg/bourdon et celle des ouvrières à 1,64 mg/bourdon, nous pouvons donc constater que le Cd 1,8 fois plus toxique pour les ouvrières (**Figure 13 A**). Mais lorsque c'est la LD50 std qui est comparée, nous n'observons plus de différence dans la résistance des ouvrières et des mâles (DRC, $p = 0,262$) (**Figure 13 B**). Donc quand la masse est prise en compte dans le calcul de la LD50, la résistance des ouvrières est la même que celle des mâles.

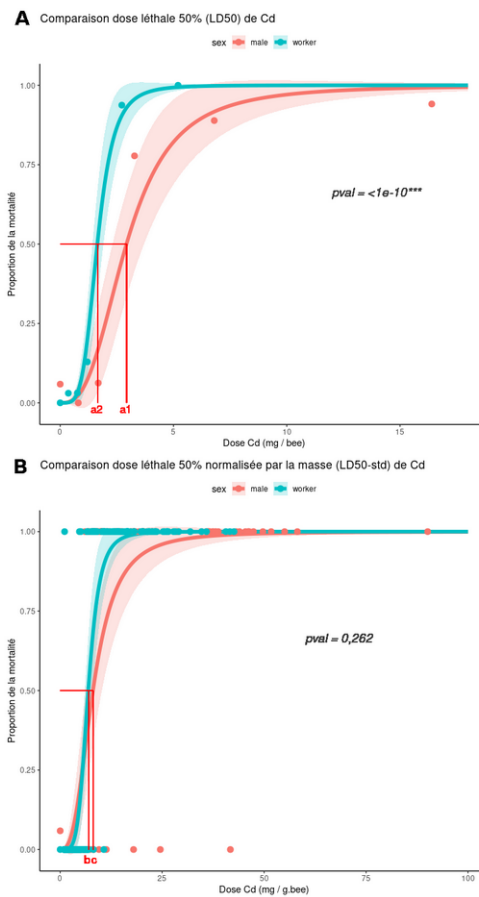


Figure 13. Comparaison des courbes doses-réponses entre les sexes (ouvrières = bleu, mâles = rouge) de la LD50 (A) et la LD50 std (B). $a = 2,93$; $b = 1,64$; $c = 8,04$; $d = 6,88$. Les valeurs de toxicité ont été calculées avec la “dose response model”, les significativités entre les courbes ont été calculées avec la fonction `compParm()`. Le seuil alpha est fixé à 0,05 et les calculs ont été réalisés avec le package “drc” du logiciel R.

4.1.2. Analyse des courbes de survie

Courbe de survie générale aux différents traitements

Pour voir si la dynamique de survie des traitements au Cd et au Cu diffère, une comparaison de leurs courbes avec celle du groupe contrôle a été réalisée. Pour le Cu, les concentrations à 876 mg/L et 1618 mg/L à 24h se démarquent du groupe contrôle (Mantel-Cox, $p_{876} = 9e-5$; $p_{1618} = 2e-9$) avec une diminution respective de la survie de 68% et de 12%. Les autres concentrations ne sont pas différentes du groupe contrôle (**Figure 14 A et D**). Pour le Cd, les concentrations de 68 mg/L et de 130 mg/L montrent une tendance de survie identique entre elles (Mantel-Cox, $p = 5e-3$) et différente du groupe contrôle (Mantel-Cox, $p_{68} < 1e-10$; $p_{130} < 1e-10$). Le traitement à 30 mg/L montre aussi une tendance différente du groupe contrôle (Mantel-Cox, $p = 2e-3$). Les autres traitements ne sont pas différents du groupe contrôle (**Figure 14 B et D**).

Comparaison de la survie à forte concentration

Comme les courbes de survie aux plus hautes concentrations en Cu (1618 mg/L) et en Cd (130 mg/L) dessinent une tendance différente, nous les avons comparées et mises en perspective avec la LC50. Ces deux courbes se sont avérées être différentes (Mantel-Cox, $p = 6e-3$) (**Figure 14 C**). La plus haute concentration de Cu est +/- 2 fois plus élevée que sa LC50 ; la tendance de survie qui se dessine est une forte diminution de la survie dès les premières 24h et puis une diminution plus faible et constante. Pour le Cd, la plus haute concentration représente +/- 3,1 fois sa LC50 ; la tendance de survie qui se dessine est une diminution modérée et assez constante. Donc, malgré le fait que la concentration de Cd est 3 fois plus élevée que sa LC50, la diminution de sa survie semble être moins abrupte comparée à celle du Cu ou la concentration n'est que 2 fois supérieure à sa LC50, ce qui montre une potentielle différence dans la toxicocinétique de ces deux métaux.

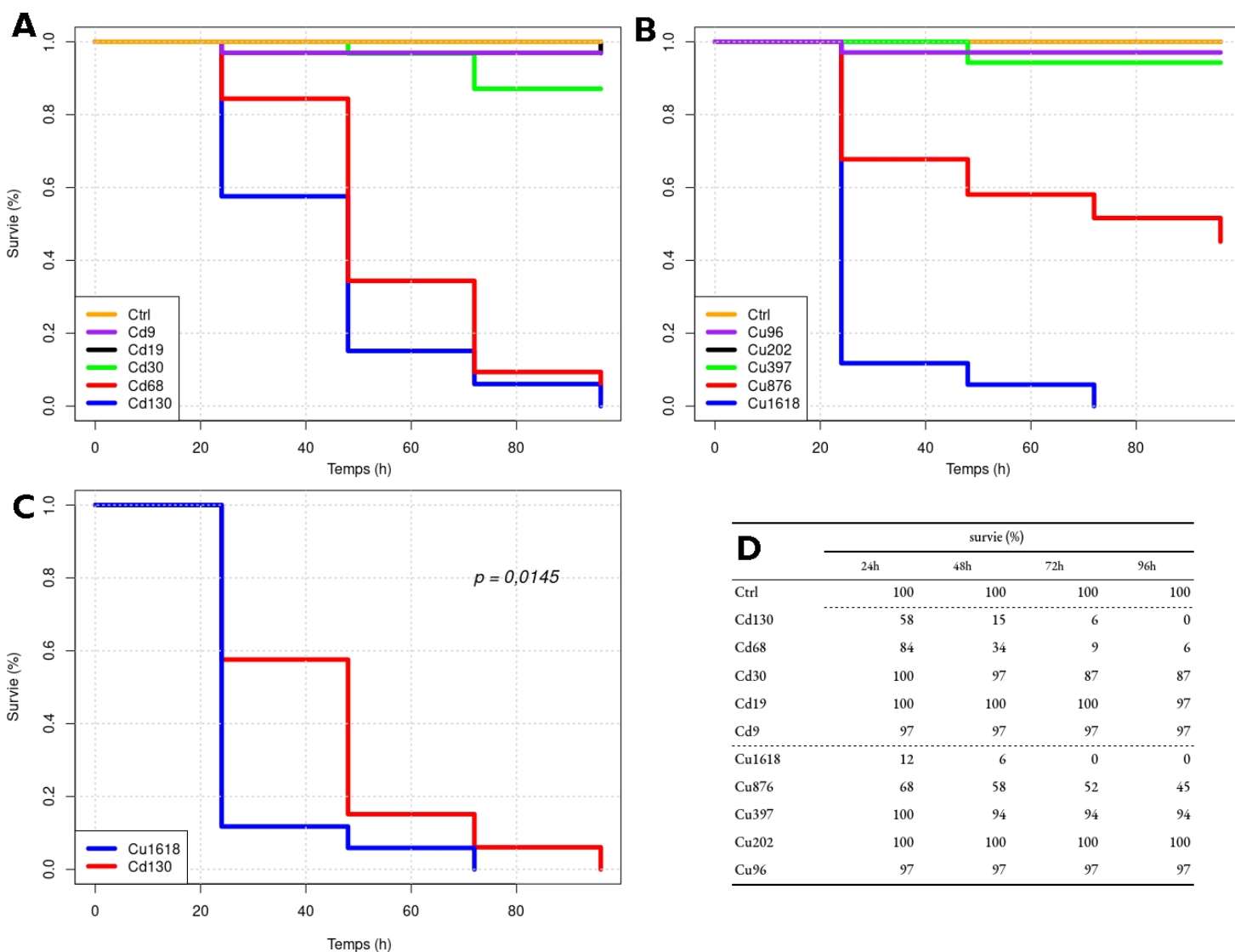


Figure 14. Courbes de survie des ouvrières traitées aux différentes concentrations de Cu (A) et de Cd (B) (mg/L) et comparaison de la survie des ouvrières à 1618 mg/L de Cu et 130 mg/L de Cd (C). D = Table des proportions de survies pour les traitements au Cu et au Cd pour chaque mesure de mortalité relevée à 24 - 48 - 72 - 96 h. Les significativités ont été calculées par un test de Log-Rank (Mantel-Cox) et sont fixées à un seuil alpha de 0,05, celles-ci sont représenté dans le texte. Les courbes de survie et les significativités ont été réalisées avec le package “survival” du logiciel R.

4.1.3. Impact sur la physiologie digestive

Analyse de la noirceur du tube digestif

Comme illustré sur la **figure 15**, à des concentrations élevées en métaux, nous avons observé un noircissement du tube digestif. Les dégâts intestinaux se sont avérés être différents entre les traitements pour le Cu (Kruskal-Wallis, $p = 2,92e-07$) et le Cd (Kruskal-Wallis, $p = 2,73e-10$).

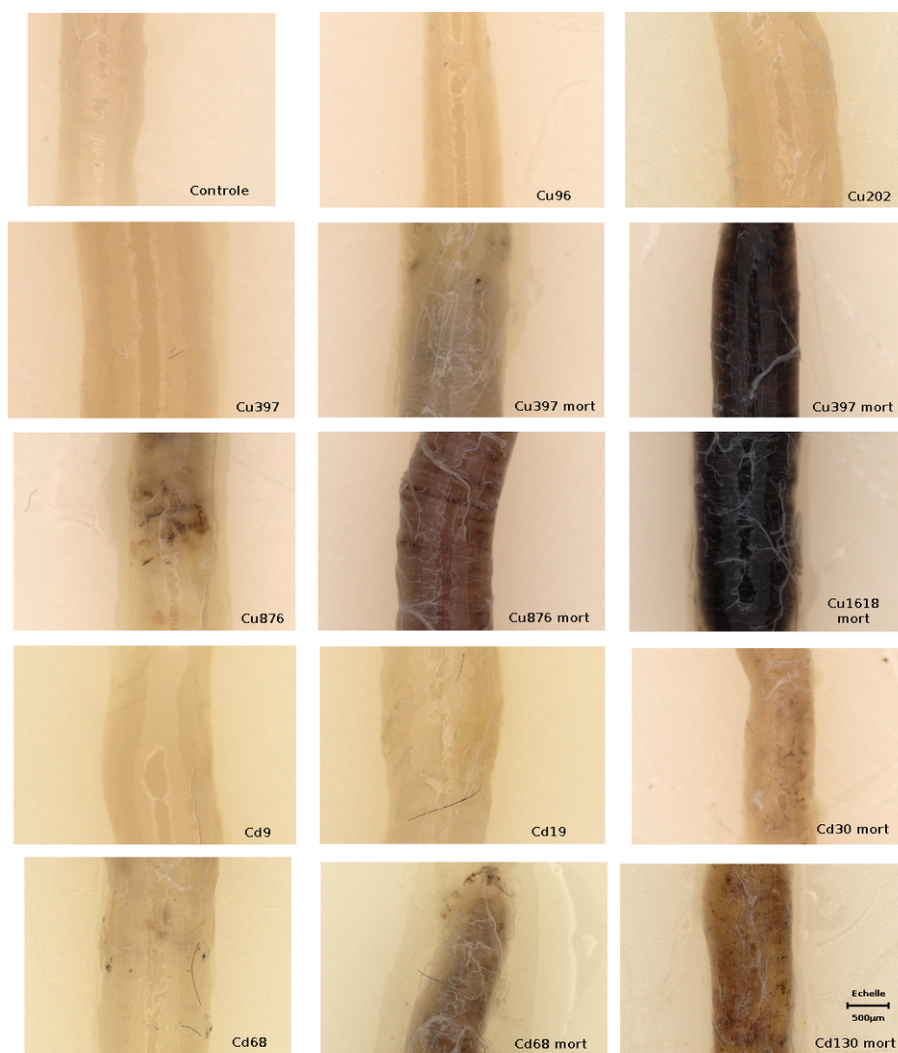


Figure 15. Illustration de la dissection de plusieurs tubes digestifs des ouvrières pour chaque traitement au Cu et au Cd. Pour les ouvrières mortes durant l'expérience, le mot 'mort' est inscrit à côté du traitement. Ces photos ne sont donc pas représentatives de la globalité des données de noircissement du tube digestif. Les photos ont été prises avec un Keyence© VHX-970F dont les paramètres étaient : luminosité manuelle = 13.25, grossissement = 50x.

Pour le Cu, nous avons observé une augmentation des dégâts à 876 mg/L (Dunn, $p = 3,06e-3$) et 1618 mg/L (Dunn, $p = <1,62e-5$) comparé au groupe contrôle et une différence entre ces traitements (Dunn, $p = 4,27e-3$), avec une augmentation des dégâts à 1618 mg/L. Les dégâts aux autres concentrations ne sont pas différents du groupe contrôle (Dunn, $p_{397} = 0,911$; $p_{202} = 0,554$; $p_{96} = 0,864$) (**Figure 16 C**). Pour le Cd, nous observons aussi une augmentation des dégâts comparés au contrôle aux fortes concentrations qui sont de 68 mg/L (Dunn, $p = 1,9e-3$) et 130 mg/L (Dunn, $p = 0,00116$), ces dégâts ne sont par contre pas différents entre eux (Dunn, $p = 0,863$). Les dégâts aux autres concentrations ne sont pas différents du groupe contrôle (Dunn, $p_9 = 0,978$; $p_{19} = 0,457$; $p_{30} = 0,798$) (**Figure 16 D**).

Pour le Cu, nous observons une augmentation des dégâts en fonction de la concentration alors que ce constat n'est pas observé pour le Cd. De plus, la réponse de mélanisation est plus forte pour le Cu que le Cd à leur plus forte concentration (Kruskal-Wallis, $p = 5,94e-6$), même si la concentration de Cu n'est que 2 fois plus toxique que sa LC50 comparé au Cd qui est 3 fois plus toxique.

Analyse de la consommation et de la masse des ouvrières

La consommation des ouvrières 24 h après leur exposition est différente en fonction des traitements pour le Cu (Kruskal-Wallis, $p = <1e-10$) et le Cd (Kruskal-Wallis, $p = <1e-10$).

Pour les deux métaux, nous avons observé une diminution de la consommation en fonction de l'augmentation des concentrations. Pour le Cu, la consommation de sucre à 876 mg/L est différente de la consommation à 1618 mg/L (Dunn, $p = 0,0162$) (**Figure 16 A**), comme observé pour les dégâts qui étaient différents à ces concentrations (**Figure 16 C**). La consommation du groupe contrôle est identique au traitement à 96 mg/L (Dunn, $p = 0,181$), mais différente des autres traitements (Dunn, $p_{202} = 0,00495$; $p_{397} = 4,16e-5$; $p_{876} = 9,96e-9$; $p_{1618} = 7,18e-13$). Les traitements sont aussi différents entre eux, comparé à 1618 mg/L, les concentrations à 96, 202 et 397 mg/L sont toutes différentes (Dunn, $p_{96} = 7,96e-13$; $p_{202} = 5,13e-8$; $p_{397} = 6,26e-5$), et ces deux plus faibles concentrations sont différentes du traitement à 876 mg/L (Dunn, $p_{96} = 2,05e-8$; $p_{202} = 3,46e-4$). Enfin, le traitement à 96 mg/L est différent du traitement à 397 mg/L (Dunn, $p = 0,00442$) (**Figure 16 A**). Pour le Cd, nous observons une différence comparée au groupe contrôle de la consommation de sucre à 68 mg/L (Dunn, $p = 4,71e-7$) et 130 mg/L (Dunn, $p = 1,34e-10$) mais pas de différence entre eux (Dunn, $p_{130-68} = 0,08$) (**Figure 16 B**), cette observation est la même que

celle pour les dégâts intestinaux (**Figure 16 D**). La concentration de 30 mg/L est aussi différente du groupe contrôle (**Dunn, $p = 0,0429$**) et des deux autres plus hautes concentrations (**Dunn, $p_{68} = 1,34e-4$; $p_{130} = 2,24e-8$**) (**Figure 16 B**).

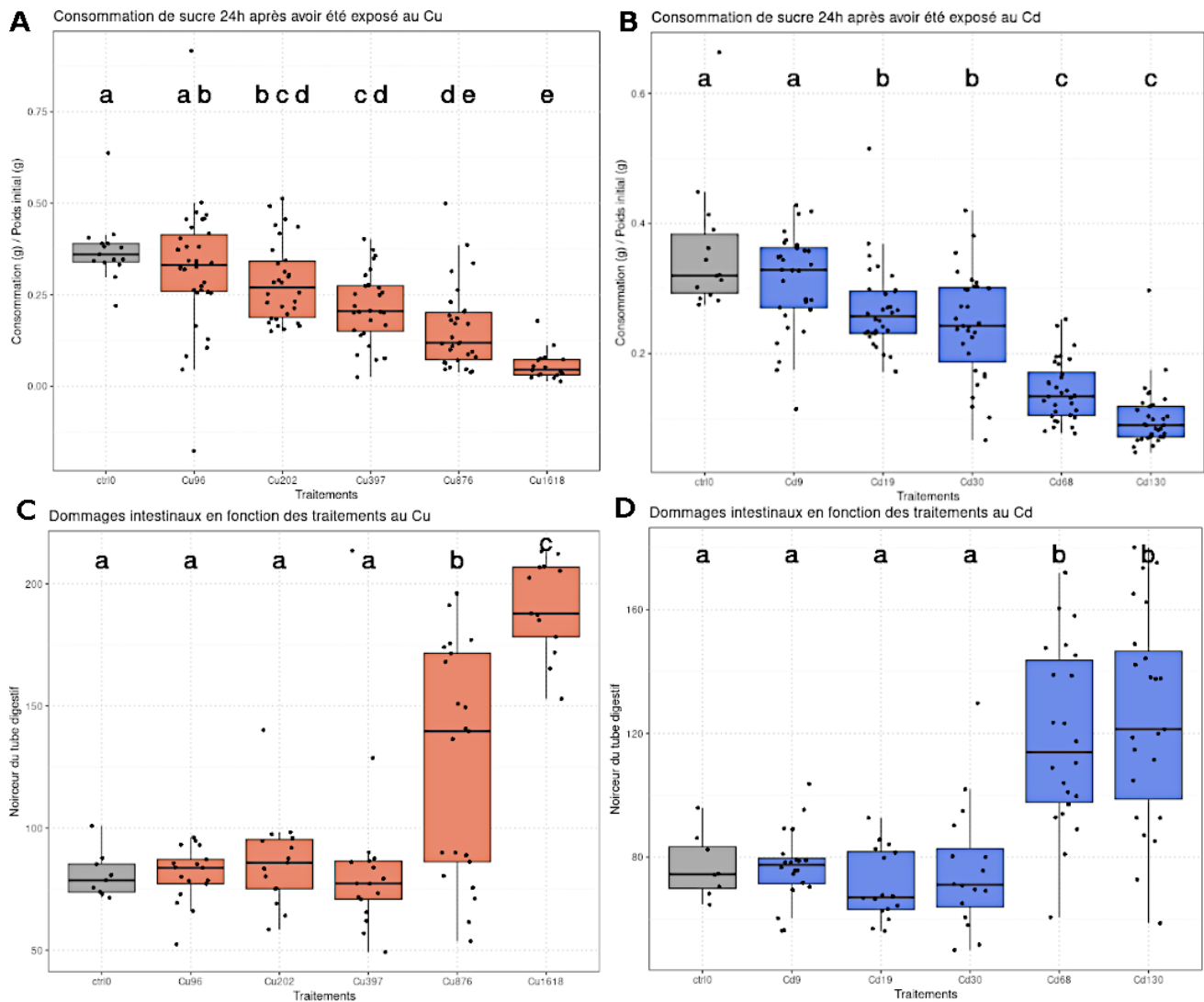


Figure 16. Consommation des ouvrières traitées aux différentes concentrations de Cu (A) et de Cd (B). Au sein d'un métal, deux concentrations ne partageant pas la même lettre présentent des résultats significativement différents. Les tests statistiques ont été calculés par un test de Dunn et fixés à un seuil alpha de 0,05. Noirceur du tube digestif des ouvrières traitées aux différentes concentrations de Cu (C) et de Cd (D). Deux concentrations ne partageant pas la même lettre présentent des résultats significativement différents. Les tests statistiques ont été calculés par un test de Dunn et fixés à un seuil alpha de 0,05.

La consommation des individus évolue de manière différente comparée aux dégâts, car aux concentrations où les dégâts ne sont pas significatifs comme 202 et 397 mg/L pour le Cu et 30 mg/L pour le Cd, nous observons une diminution de la consommation par rapport au groupe contrôle ; ces concentrations impactent donc aussi la prise de nourriture même s'il n'est pas observé de réponse de mélanisation.

Pour la masse, la diminution est différente du groupe contrôle pour des doses supérieures à la LD50 mesurée et ces résultats sont identiques que ce soit pour le Cu (Kruskal-Wallis, $p = >1e-10$) comme pour le Cd (Kruskal-Wallis, $p = >1e-10$). Ces résultats sont aussi différents entre eux, avec pour le Cd, une différence entre les groupes à 9mg/L et à 19 mg/L et les deux autres groupes au plus fortes concentrations (Dunn, $p_{9-19-68-130} = > 1E-10$), le groupe 68 mg/L n'est par contre pas différent du groupe 130 mg/L (Dunn, $p = 0,5$) et enfin le groupe de 30 mg/L n'est différent que du dernier groupe (Dunn, $p = 6,7e-5$) (Figure 17A). Pour le Cu, une différence entre les groupes est aussi observée où les deux dernières concentrations sont différentes entre elles (Dunn, $p = 0,0369$), mais aussi où les groupes 96 mg/L, 202 mg/L et 397 mg/L sont différents du dernier groupe (Dunn, $p_{96} = 2,83e-4$; $p_{202} = 1,45e-4$; $p_{397} = 2,11e-5$) (Figure 17B).

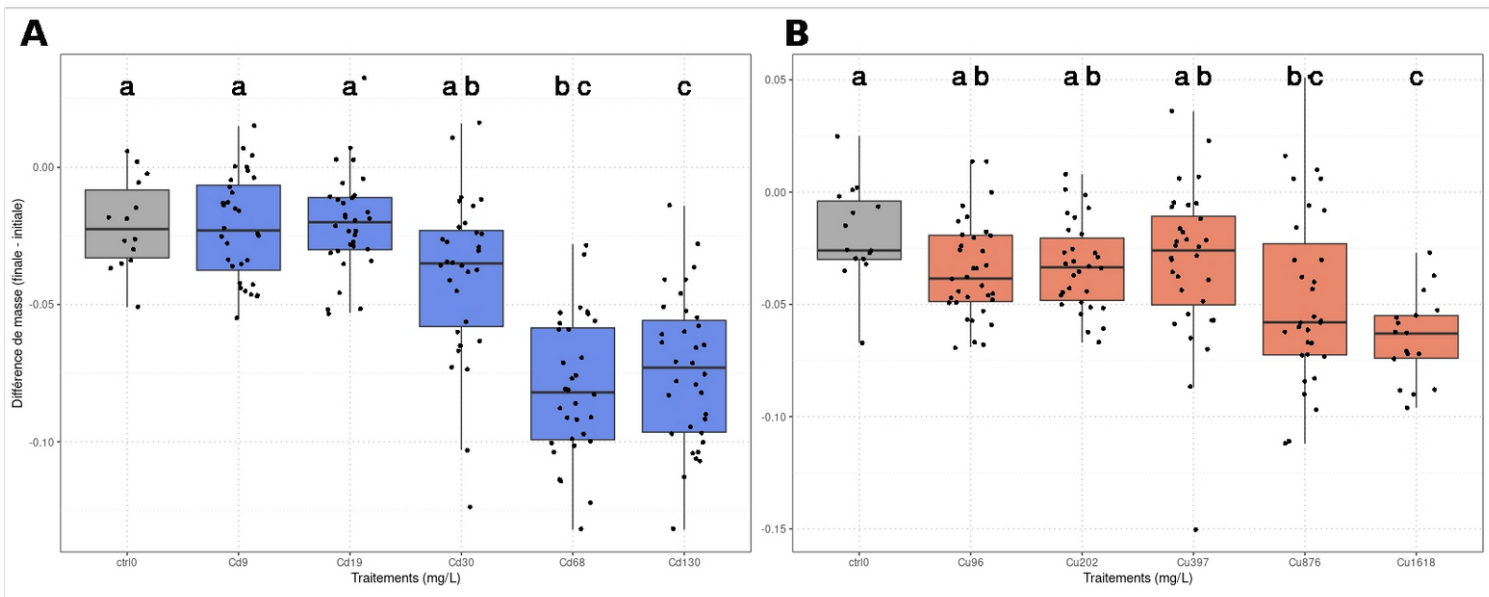


Figure 17. Masse des ouvrières traitées aux différentes concentrations de Cu (A) et de Cd (B). Deux concentrations ne partageant pas la même lettre présentent des résultats significativement différents. Les tests statistiques ont été calculés par un test de Dunn et fixés à un seuil alpha de 0,05.

4.2. Exposition chronique des larves au Cu

4.2.1. Courbes de survie

Afin de voir si le cuivre a un impact sur la survie des larves, la mortalité des individus entre traitements a été comparée sur l'entièreté de l'expérience ainsi qu'au sein des différents stades. Pour les deux traitements (contrôle et cuivre), nous avons observé une survie totale de 21%, ce qui représente 286 individus morts sur 383. Pour la courbe de survie globale, nous avons observé une différence entre le traitement au Cu et le groupe contrôle (Mantel-Cox, $p = 0,02$) (**Figure 18 A**). Mais lorsque la survie est calculée au sein de chaque stade, aucune différence de survie n'est observée pour les larves (Mantel-Cox, $p = 0,4$) (**Figure 18 B**), pour les pré-pupes (Mantel-Cox, $p = 0,1$) (**Figure 18 C**) et pour les pupes (Mantel-Cox, $p = 0,2$) (**Figure 18 D**). Il est possible que cette différence soit attribuée à la complexité statistique pour le calcul de la survie des larves.

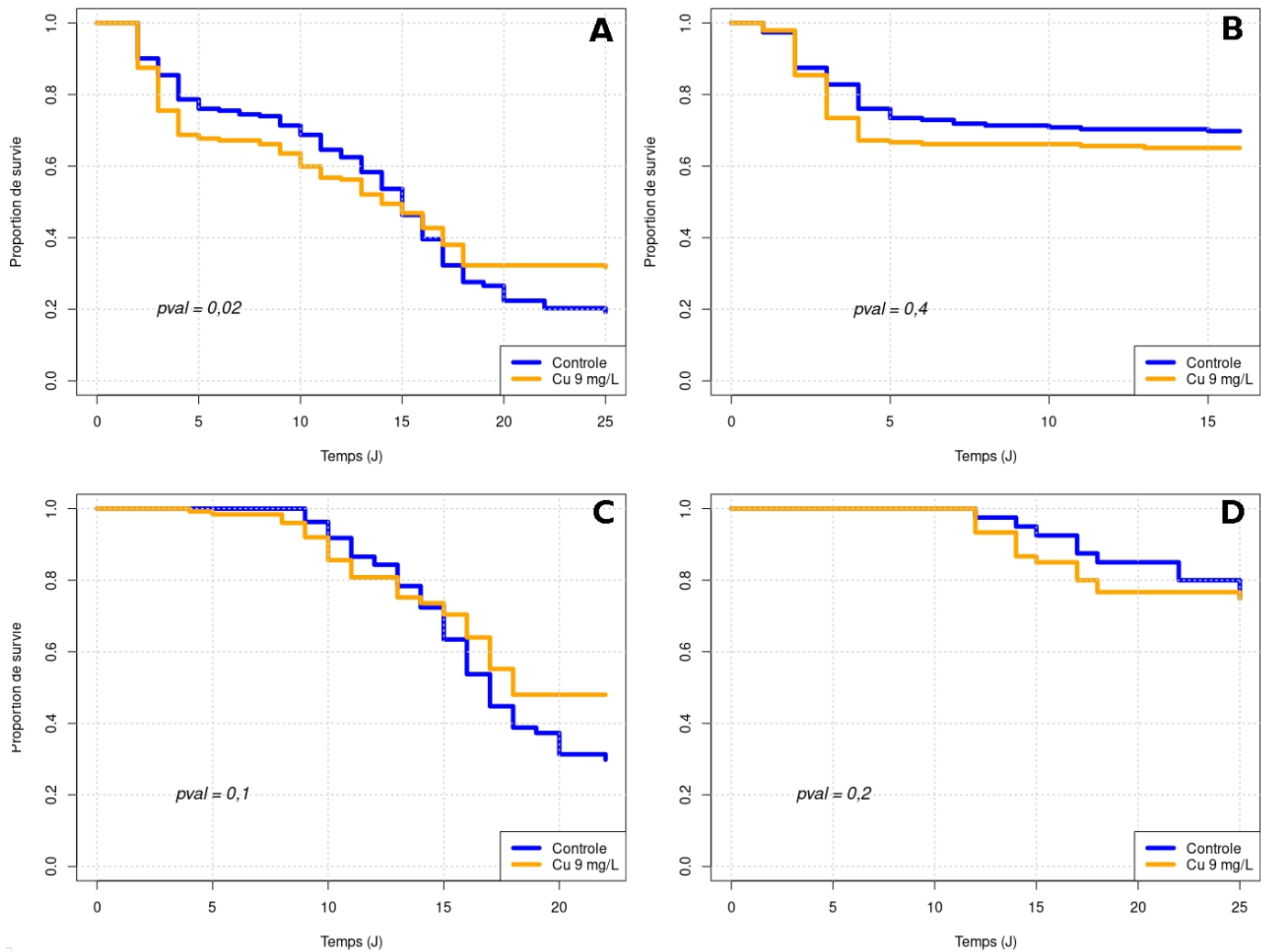


Figure 18. Graphique des courbes de survie des larves contrôle et traitées au Cu pour l'expérience globale (A), pour les larves (B), pour les pré-pupes (C), et pour les pupes (D). La différence significative a été calculée par un test de Log-Rank (Mantel-Cox) et est fixée à un seuil alpha de 0,05. Les proportions de survie sont représentées dans l'Annexe R6.

4.2.2. Analyse du développement

Croissance et masse

Aucune différence entre les traitements n'a été observée pour la masse des adultes (Wilcoxon, $p = 0,0849$), avec une moyenne de $0,10 \pm 0,01$ mg pour le contrôle et de $0,131 \pm 0,01$ mg pour le traitement au Cu (Figure 19 A). Pour la croissance des larves, nous n'avons pas non plus observé de différences (Wilcoxon,

$p = 0,0849$) (**Figure 19 B**), avec une croissance moyenne de $15,5 \pm 0,64 \text{ mm}^2$ pour le contrôle et de $17,1 \pm 0,69 \text{ mm}^2$ pour le traitement au Cu. Le traitement au Cu n'a donc pas eu d'impact sur ces différents paramètres.

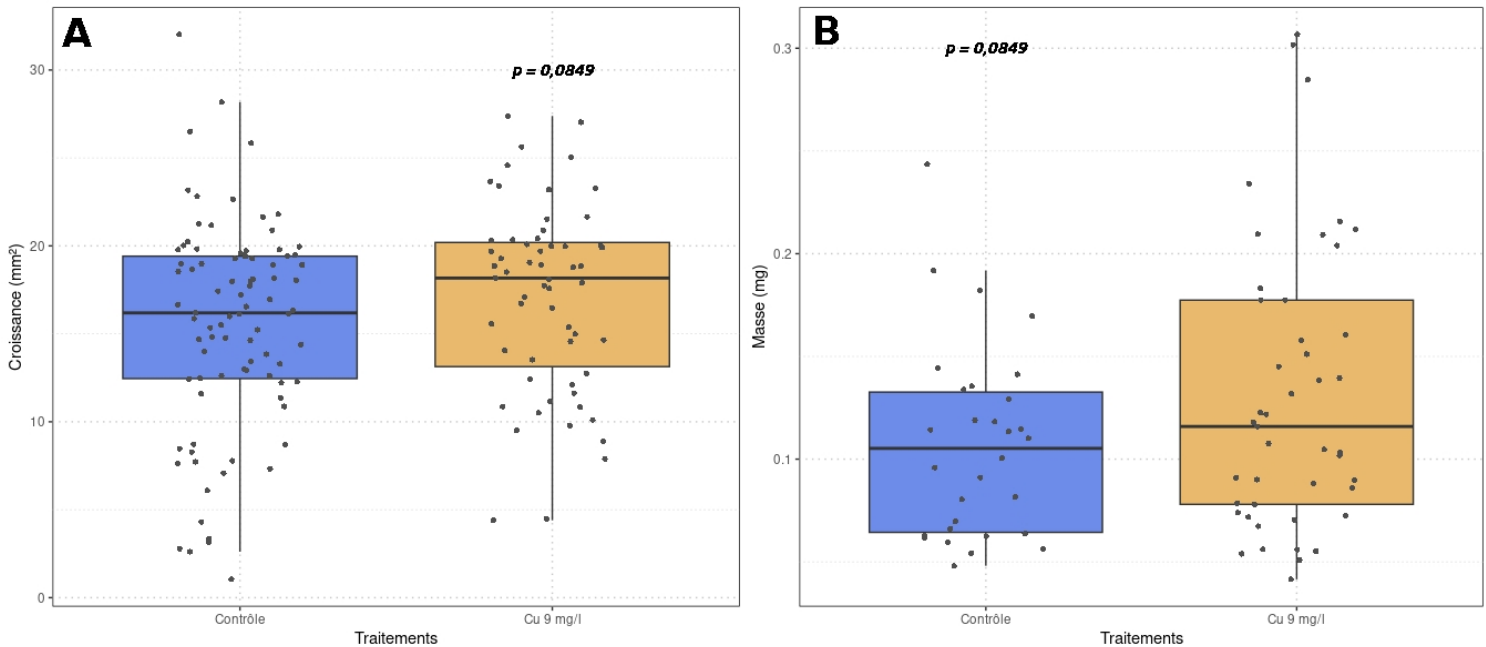


Figure 19. A : Croissance des larves entre le 1er et le 6e jour en fonction des traitements (contrôle et Cu). B : Masse des adultes émergés en fonction des traitements (contrôle et Cu). La différence significative a été calculée par un test de Wilcoxon avec un seuil alpha fixé à 0,05. Les graphiques et les statistiques ont été réalisés sur le logiciel R.

Temps de développement

Nous avons aussi regardé si le Cu avait un impact sur le temps de développement des larves, des pré-pupes et des pupes. Aucune différence n'a été observée pour le temps de développement des pré-pupes (Wilcoxon, $p = 0,815$) et des pupes (Wilcoxon, $p = 0,0937$) (**Figure 20**). La moyenne de ces temps de développement est de 4 jours pour les pré-pupes et de 6 jours pour les pupes ; ces valeurs sont identiques en fonction des traitements. Par contre, le temps de développement des larves est différent (Wilcoxon, $p = 0,00283$), avec une moyenne de temps de 7 jours pour le groupe contrôle et de 5 jours pour le traitement au Cu. Sur la **Figure 20**, il est aussi remarquable que la dispersion du temps de développement des larves est beaucoup plus variable que le temps de développement des pré-pupes et des pupes. Donc même si le Cu n'a pas

d'effet notable sur les paramètres généraux de développement, celui-ci aurait un effet d'accélération de la défécation des larves, ce qui explique pourquoi on observe une arrivée plus rapide de la nymphose pour le traitement au Cu.

Temps des différents stades en fonction des traitements

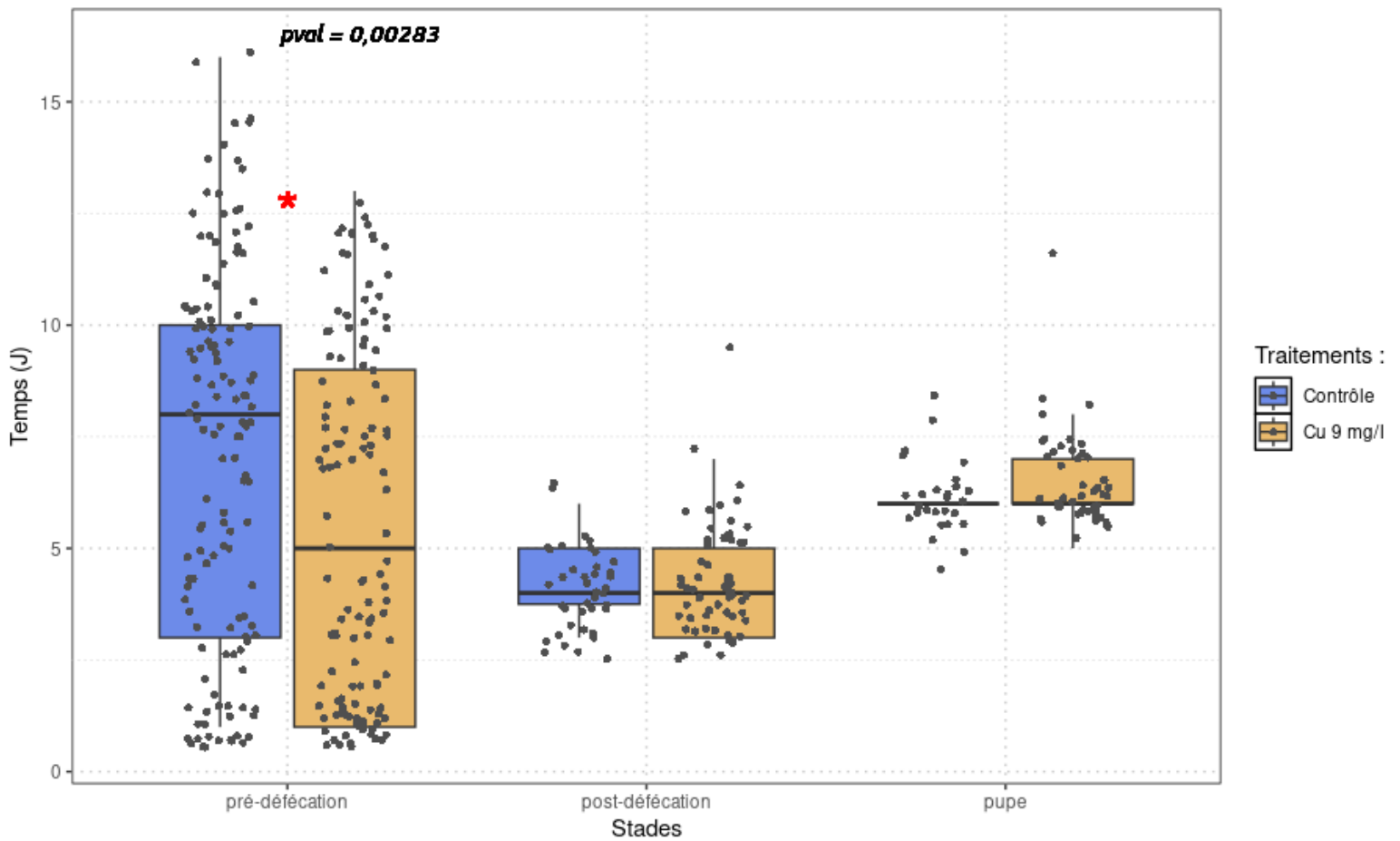


Figure 20. Temps de développement des différents stades en fonction des traitements (contrôle et Cu). L'étoile rouge représente une différence significative. Pour les trois graphiques, la différence significative a été calculée par un test de Wilcoxon avec un seuil alpha fixé à 0,05.

Discussion

5.1 Effet du Cu et du Cd sur les adultes

5.1.1 Différence de toxicité entre les ouvrières et les mâles

Comparaison de la LD50 entre les ouvrières et les mâles

Les résultats du calcul de la LD50 montrent que la mortalité causée par le Cu et le Cd n'est pas différente en fonction des sexes une fois standardisée avec la masse, par contre lorsque c'est la LD50 qui est comparé, et donc la résistance d'un organisme entier, les mâles sont plus résistants. Ce résultat est étonnant, car de par plusieurs facteurs tels que le système haplodiploïde (Friedli et al. 2020) ou la différence d'expression des gènes de détoxifications tels que les métallothionéines (Egli et al. 2006), il aurait été attendu d'observer une différence dans la résistance des individus, même après avoir été standardisé avec la masse. La résistance aux métaux semble donc principalement dépendante de la masse des individus, donc lorsqu'on ne prend en compte que les individus, les bourdons mâles sont plus résistants face aux métaux, ceux-ci étant en moyenne plus gros. Les bourdons possèdent généralement un dimorphisme sexuel avec comme individu le plus grand la reine, puis les mâles et puis les ouvrières ([del Castillo et Fairbairn 2012](#)) ; il serait donc attendu que les reines possèdent une meilleure résistance que les mâles.

Une augmentation de la résistance causée par la masse serait le résultat d'une meilleure gestion au niveau de la détoxification des polluants : en effet, un corps plus grand aurait plus facile à stocker ou à éliminer les métaux. Cette observation entre la résistance aux métaux et la taille a été faite chez des éphémères et les résultats montrent que les petits insectes sont plus sensibles que les grands (Cadmus et al. 2020).

LD50 autres espèces

L'utilisation de *B. terrestris* comme espèce modèle est basée sur le fait que cette espèce est facilement accessible, qu'elle n'est pas complètement domestiquée ([Brown et al. 2022](#)). Cependant, si nous voulons prendre en compte l'impact des métaux sur tout type d'abeilles, il est important de prendre en compte la résistance des différentes espèces à ces métaux. Cette comparaison de résistance peut se faire au travers de la LD50 : une étude réalisée par Arena et Sgolastra a montré qu'il existait de grandes différences de résistance dans l'exposition des pesticides entre les différentes espèces d'abeilles ([Arena et Sgolastra 2014](#)). Il serait donc très pertinent de réaliser cette comparaison aussi pour les métaux.

Importance des castes dans le maintien du fitness

Il est important pour évaluer l'impact des métaux sur le fitness de regarder leur effet sur les différentes castes, mais aussi sur le rôle qu'ont ces castes à maintenir la reproduction de l'espèce et le couvain. Des études ont montré que chez les mâles, certains pesticides diminuent la fertilité des spermatozoïdes notamment en impactant leur quantité et leur viabilité (Strobl et al. 2021). Mais aucune étude ne s'est penchée sur l'effet des métaux à ce niveau. Pour les ouvrières, c'est le comportement général qu'il est important d'étudier, car ce sont elles qui maintiennent le couvain et apportent la nourriture. Dans le cadre des expériences du mémoire de Luca Dorio, nous avons démontré qu'à des concentrations environnementales, certains métaux tels que le Cu est détecté par les ouvrières alors que d'autres métaux comme le Cd, plus toxique encore, ne sont pas détectés (Dorio, 2024). Ces derniers ont donc plus de risques d'entrer dans le couvain. D'autres articles ont aussi montré l'effet négatif des métaux sur la cognition des ouvrières en impactant leur apprentissage et leur mémoire appétitive (Monchanin et al. 2021). Enfin, il est primordial d'évaluer l'effet des métaux sur la reine, mais très peu d'études ont mené des recherches à ce sujet. En effet, les reines peuvent accumuler les métaux dans leurs tissus comme les autres castes sauf pour le Cu et le Se (Hladun et al. 2016) ; il est donc possible que la gestion des métaux chez la reine soit différente de celle des autres castes.

5.1.2. comparaison de la toxicité du Cu et du Cd chez les ouvrières

Il est important de remarquer que la toxicité du Cu est différente de celle du Cd, une différence qui a été mise en lien avec la nature essentielle et non-essentielle du métal.

Comme expliqué plus haut, les métaux essentiels tels que le Cu possèdent des systèmes d'absorption spécifiques (Folwell, Barton, et Shepherd 2006); (Tibbett et al. 2021) en plus d'être stockés dans plusieurs parties du corps afin d'être cellulièrement et biochimiquement utilisés (Ballan-Dufrançais 2002 ; Valko, Morris, et Cronin 2005). Le Cu est utilisé dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la fixation de l'oxygène, la catalyse de réaction enzymatique ou le bon déroulement du développement neurologique normal (Navarro et Schneuwly 2017) et sa toxicité est causée par plusieurs phénomènes notamment le stress oxydatif (Jaishankar et al. 2014) et le dysfonctionnement de toutes les fonctions physiologiques. La toxicité du Cd est quant à elle causée de manière indirecte en induisant un stress oxydatif sans directement agir sur la production de ROS ou en libérant les métaux séquestrés dans les métalloprotéines (**Figure 21**) (Henkler, Joep, et Luch 2010). Il est donc possible, comme illustré sur la **figure 14**, que le type de toxicité aient un

impact sur la toxicocinétique de ces éléments. Une idée spéculative serait que le Cu, en impactant directement le fonctionnement normal de l'organisme, provoquerait, du point de vue toxicocinétique, la mort de manière plus "soudaine" que le Cd. Le Cd, même s'il peut être absorbé par plusieurs voies (Tibbett et al. 2021), est directement considéré par l'organisme comme une substance toxique, donc sa détoxification est plus constante (Braeckman et al. 1999) comparé au Cu. Il est donc nécessaire de réaliser plus de recherches afin de vérifier cette théorie.

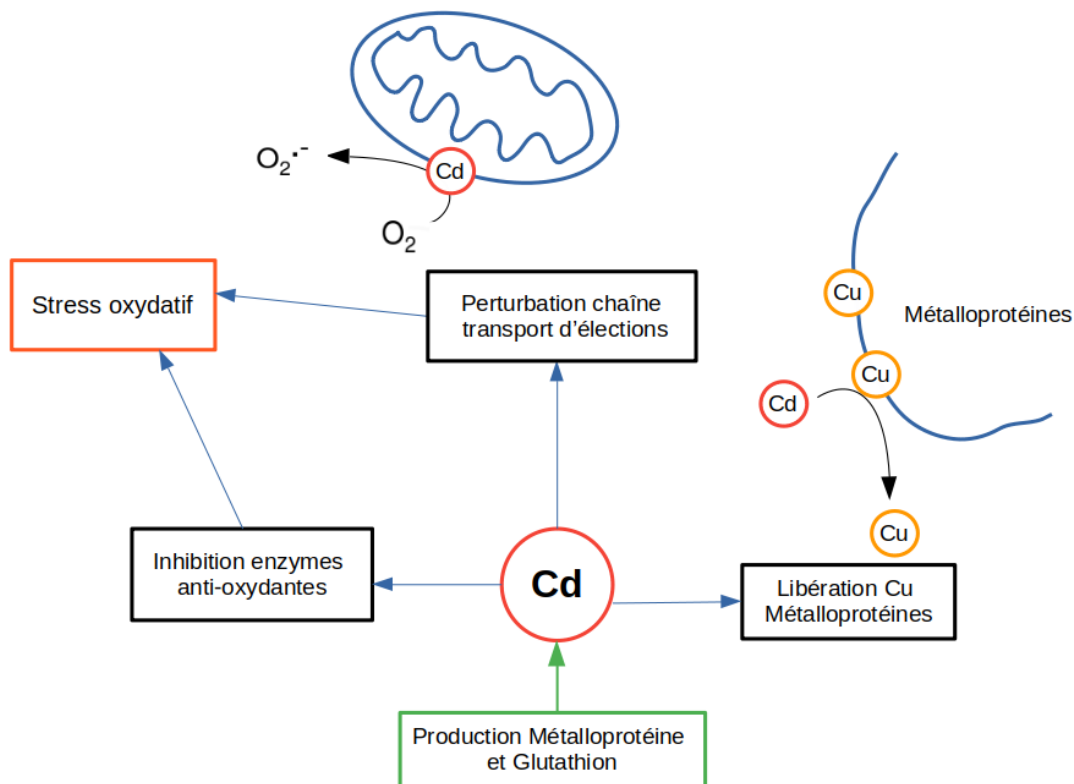


Figure 21. Schéma de la toxicité du Cd sur les cellules animales. Le Cd, malgré le fait qu'il induise la production de métalloprotéines et de glutathion pour lutter contre sa toxicité, peut induire un stress oxydatif ce qui aura pour conséquence de mener la cellule à l'apoptose. De plus, cet élément peut libérer des métaux séquestrés dans les métalloprotéines ce qui augmente sa toxicité, Figure inspiré de l'article de Henkler, Joep, et Luch 2010.

5.1.3. Effet générale sur le tube digestif

Dégâts au tube digestif

Après dissection du tube digestif des ouvrières exposées, comme illustré sur la **figure 15**, une noirceur de l'intestin moyen est observée. Cette noirceur est probablement le résultat de l'excrétion des cellules cylindriques mortes après accumulation et intoxication aux métaux comme cela a été observé dans d'autres études pour le Cu et le Cd (Bednarska et al. 2016). Il existe trois processus principaux d'excrétion des cellules : l'apoptose et la nécrose qui sont impliquées dans la dégradation des cellules épithéliales, et l'autophagie qui est principalement impliquée dans l'élimination des organites cellulaires endommagés tels que les vacuoles et les lysosomes (Dabour et al. 2019). Il semblerait donc que l'excrétion des cellules mortes soit un des moyens de gestion les plus utilisés par les abeilles à un dosage supérieur à la LD50, donc lorsque la dose est létale. Il est intéressant de remarquer que l'intensité de la noirceur est plus forte pour les individus exposés au Cu. En effet, il semblerait que les abeilles aient la capacité d'excréter une plus grande quantité de ce métal avant de mourir, ce qui expliquerait cette noirceur plus élevée. Cette intensité est peut-être aussi le résultat de la cause de la mort des cellules, le Cu ayant la capacité d'induire directement la production de ROS (Jaishankar et al. 2014) et de dérégler le bon fonctionnement physiologique des cellules (Navarro et Schneuwly 2017).

Une mélanisation du tube digestif est aussi observée sur certains tubes digestifs (**figure 22**). Cette réaction se manifeste généralement lors d'un dérèglement du microbiote, ce qui créerait une réaction immunitaire suite à la prolifération de bactéries pathogènes (Binggeli et al. 2014) ; (Emery, Schmidt, et Engel 2017) mais il est aussi possible que ce processus soit le résultat de l'exposition aux métaux. Les métaux pourraient donc entre autre induire une perturbation du microbiote intestinal un processus important pour le maintien des colonies des abeilles eusociales primitives (Ladomersky et Petris 2015) ; (Wang et al. 2019). Cette réaction de mélanisation se réalise généralement au niveau du pylore de l'intestin moyen (Engel, Bartlett, et Moran 2015). De plus, le Cu est un élément indispensable à la mélanisation par son utilisation en tant que cofacteur pour oxyder le phénol en quinone (González-Santoyo et Córdoba-Aguilar 2012b) ; (Khan et Lang 2023), il est donc possible que donner des métaux aux abeilles augmente les chances de formation de la mélanisation.

Au niveau des autres paramètres mesurés que sont le poids et la consommation, nous observons une diminution de chacun de ces paramètres avec l'augmentation de la dose de métal. La toxicité des métaux

touche donc aussi le comportement de nutrition au 1 jour après exposition ainsi que la masse des individus, ce qui veut dire que toute la physiologie de l'insecte est touchée. C'est directement lié à la physiologie digestive, car il est possible que la diminution de la nutrition ait engendré la diminution du poids suite à, l'utilisation des réserves de gras, par exemple.

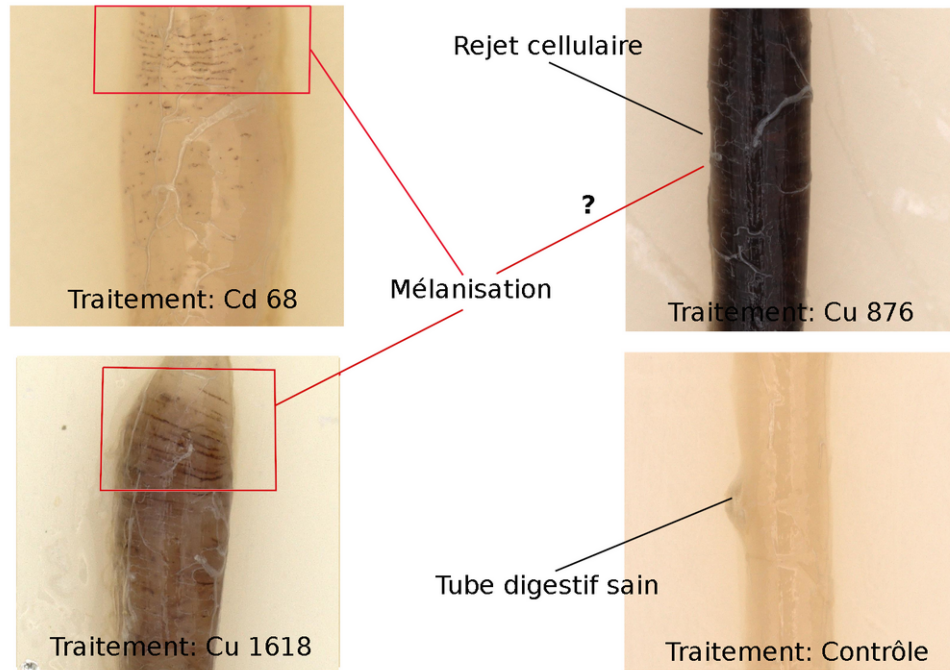


Figure 22. Montage photo des différents tubes digestifs retrouvés après dissection. Les deux tubes digestifs à gauche sont des tubes digestifs ayant potentiellement développé de la mélanisation. Le tube digestif noir est un tube digestif probablement rempli de cellules nécrosées et le tube digestif en bas à droite est un tube digestif sain. Figure réalisée sur Gimp.

5.2. Effet du Cu et du Cd sur le développement

L'observation principale effectuée durant cette expérience est l'accélération de la défécation des larves lorsqu'elles sont nourries avec du Cu. La première défécation effectuée par les larves est leur manière de se détoxifier des toxines (Weiss 2006 ; Scott, Lanno, et Gardiner 2024). Il est donc possible que le Cu ait indirectement accéléré ce phénomène afin de détoxifier le corps des larves. Le Cu aurait la capacité d'accélérer le métabolisme de croissance et donc la métamorphose des larves. Par contre, le temps de développement des pré-pupes et des pupes n'est pas différent entre les traitements.

Pour les autres paramètres, nous n'avons pas observé de différence significative dans la croissance ou la masse. Cela s'explique par le fait que la concentration en Cu utilisée est de 11,7 mg/L ce qui est vraiment

peu, en comparaison de la LD50 des adultes qui est de 788 mg/L. Les larves sont des organismes beaucoup plus sensibles que les adultes ([Di et al. 2016](#)) ; il n'est donc pas étonnant d'observer une perturbation au niveau de leur système de détoxification. La cause de cette sensibilité plus accrue pourrait être le fait que les larves possèdent une capacité réduite de régulation ionique et de défense immunitaire par rapport aux adultes ([Ballan-Dufrançais 2002](#) ; Zhou, Cadigan, et Thiele 2003).

Au niveau de la mortalité, une différence significative a été observée dans la mortalité des larves pour l'expérience en globalité, mais aucune différence n'est observée lorsqu'on regarde la mortalité des larves pour chaque stade. Étonnamment, ce sont les larves traitées au Cu qui possèdent une proportion de survie plus élevée à la fin de l'expérience. C'est durant la survie des pré-pupes que cette différence se marque fort. Par contre, pour la mortalité mesurée uniquement durant le stade de larve, ce sont les individus traités au Cu qui meurent le plus. Les statistiques utilisées pour mesurer la mortalité des larves sont compliquées et en fonction des codes utilisés, nous obtenons des résultats différents (Therneau 2024). Il aurait été attendu que les larves traitées au Cu et de plus petite taille au début de l'expérience possèdent une mortalité plus élevée, mais cette différence n'a pas été observée dans ce mémoire.

Perspectives

Lors de cette étude, plusieurs perspectives ont été émises quant à l'étude de l'effet des métaux sur les abeilles. Peu de recherches ont été publiées dans la littérature scientifique ; c'est pourquoi il est vraiment intéressant de creuser le sujet.

Au niveau de l'étude de l'impact sur le fitness, il aurait été très intéressant d'étudier l'effet des métaux sur les reines, qui est une caste-clé dans le maintien du fitness de l'espèce. Pour ce faire, il aurait fallu exposer la reine à chaque moment important de son cycle de vie, c'est-à-dire avant la reproduction, après la reproduction et après la diapause (L. Wang et al. 2019b). La fertilisation des reines est aussi une étape clé du cycle de vie des bourdons, il serait donc intéressant de voir l'effet des métaux sur le comportement de reproduction, mais aussi sur la fertilité des spermatozoïdes des mâles.

Dans notre étude, nous avons utilisé un métal essentiel et un non-essentiel qui sont le Cu et le Cd, mais il existe de nombreux autres métaux intéressants à étudier tels que le Zn ou le Pb, retrouvé notamment en abondance dans l'environnement (Zhang et Wang 2020). Regarder de manière générale s'il existe une similitude d'effet entre les métaux essentiels et non-essentiels pourrait aussi s'avérer intéressant afin de trouver une généralité dans leurs effets. Au vu des possibles différences au niveau de la cinétique de mortalité du Cu et du Cd, il serait aussi essentiel de déterminer si cette cinétique, à savoir que le Cu provoque une mortalité aiguë comparée au Cd qui provoque une mortalité continue, soit réellement un fait en axant les études sur ce sujet.

Même si aucune différence de mortalité entre les mâles et les femelles n'a été observée, il serait néanmoins essentiel de déterminer l'effet haplo-diploïde des bourdons sur leur résistance face aux métaux, notamment au travers des gènes codant pour les métallothionéines (Shirley et Sibly 1999). Comprendre leur fonctionnement est intéressant, car il est notamment très important de comprendre leur expression.

Au niveau de l'impact sur le tube digestif, il serait intéressant de voir à quelle concentration il est possible d'observer des sphérites minéralisées dans les cellules de stockage (cellules cylindriques) comme mentionné dans l'introduction (Polidori et al. 2018). De plus, l'analyse des déchets cellulaires noirs contenus dans l'intestin moyen serait une bonne manière de déterminer les causes de ce phénomène. Enfin, comme certains tubes digestifs présentent de la mélanisation, il serait aussi intéressant d'analyser l'impact des métaux sur le microbiote.

Pour les larves, seule une exposition orale a été réalisée ; il aurait été cependant aussi intéressant de réaliser des expositions cutanées en induisant la présence de métaux dans la cire, ce qui est une des voies de contamination possibles dans l'environnement naturel. De plus, les larves qui ont été isolées dans les plaques multi-puits étaient à un niveau de croissance assez élevé, car la plupart avaient déjà été isolée dans des cellules. Mais étudier l'effet des métaux sur les premiers stades larvaires, donc quand ceux-ci n'ont pas été isolés de leur cellule, est quelque chose d'intéressant, car ces stades ont un développement plus sensible que les larves plus avancées (Hendriksma, Härtel, et Steffan-Dewenter 2011).

Enfin, l'effet du Cu sur le développement a montré une plus grande fragilité des larves au Cu ; il serait donc intéressant de voir si ce phénomène est aussi observé pour d'autres métaux essentiels tels que le Zn. De plus, l'effet des métaux non-essentiels est encore largement méconnu : surtout qu'il semblerait que ceux-ci aient des effets différents des métaux essentiels chez les adultes et probablement aussi chez les larves et dans leur développement.

Conclusion

Pour conclure, la réponse aux différents tests d'hypothèse représentés sur la **Table 3** nous permette de tirer les conclusions suivantes :

1) **Quels est le niveau de toxicité du Cu et du Cd et cette toxicité est-elle identique pour les ouvrières et pour les mâles ?** La réponse à cette question est donc que le Cd possède une toxicité 19 fois plus élevée que le Cu et que la résistance entre les ouvrières et les mâles est identique. Cette résistance est identique que lorsque la masse est standardisée avec la LD50 ; il est donc possible que la masse joue un rôle majeur dans la résistance à ces deux métaux.

2) **Quel impact le Cu et le Cd ont sur la physiologie digestive ?** Comme nous avons pu le remarquer, à des concentrations proches ou au-delà de la LD50, pour les deux métaux, il est possible qu'il y ait une forte excrétion de déchets cellulaires au niveau de l'intestin moyen, ce qui veut dire que le système de détoxification des métaux est certainement saturé, ce qui endommage la paroi intestinal. De plus, il est aussi observé une mélanisation dans certains cas, ce qui suggère une perturbation du microbiote intestinale. La prise de ces deux métaux diminue aussi le poids général des ouvrières et leur consommation ; il est donc possible que ces éléments aient aussi d'autres impacts comme sur le système nerveux.

3) **La concentration environnementale de Cu peut-elle perturber le développement et la mortalité des larves de *B. terrestris* ?** Du point de vue de la mortalité, la réponse est assez mitigée ; en effet, nous observons une différence dans la mortalité globale, mais pas dans la mortalité de chaque stade. Il est donc possible que des erreurs statistiques nous empêchent de répondre correctement à cette question. Quant au développement, nous avons cependant observé une perturbation dans le temps de défécation qui s'accélère de 2 jours lorsque les larves sont nourries au Cu.

Table 3. Test d'hypothèse émis et réponse de ces tests. Ces tests ont permis de répondre aux trois questions biologiques principales.

	Test d'hypothèse	Résultat de l'hypothèse
Exposition des adultes	La toxicité du Cd est-elle différente entre les ouvrières et les mâles ?	non
	Les courbes de survie des traitements au métaux sont-elles différentes de la courbe de survie du groupe contrôle ?	Pour les concentrations au dessus de la LD50 oui
	La dynamique de survie des ouvrières traitées à 1618 mg/L de Cu est-t-elle différente que pour les ouvrières traitées à 130 mg/L de	oui

	Cd ?	
	La consommation de sucrose 24 h après l'administration du traitement est-elle différente entre les différents traitements ?	oui
	La masse des ouvrières est-elle différente entre les traitements pour un même métal ?	oui
	Les différents traitements ont-ils eu un effet sur la noirceur du tube digestif après dissection ?	Pour les deux plus fortes concentrations en métaux oui
	la noirceur du tube digestif du Cu à 1618 mg/L est-elle différente de la noirceur du tube digestif du Cd à 130 mg/L ?	oui
Exposition des larves	La survie des individus traités au Cu durant tout leur développement est-t-elle différente que la survie des larves non traitées ?	oui
	la survie des larves/pré-pupes/pupes est-elle différente que la survie du groupe contrôle ?	non
	La croissance des larves entre le 1er et le 6e jours est-elle différente entre les larves nourries avec et sans Cu	non
	La masse à l'émergence est-elle différente entre les larves traitées et non traitées au Cu ?	non
	Le temps de développement des larves/des pré-pupes/des pupes est-il différent entre le traitement au Cu et le groupe contrôle ?	Oui seulement pour le temps de développement des larves

Dans cette conclusion, nous pouvons aussi dire que la toxicité du Cu semble être assez différente de celle du Cd. Le Cd possède une plus forte toxicité que le Cu car sa LD50 a été mesurée à 110 mg/g.bee comparé à 6,88 mg/g.bee pour le Cd. De plus, aucune différence n'a été observée entre la résistance des mâles et des ouvrières, lorsque la LD50 a été standardisée avec la masse, ce qui laisse croire que la principale cause d'une plus grande résistance chez les mâles est leur poids et non une plus grande production de métallothionéines.

La nature du métal influence probablement sur l'effet de ceux-ci sur les ouvrières : il semblerait que la toxicocinétique du Cu soit différente de celle du Cd en plus des effets généraux sur la physiologie digestive tel que la gestion de la détoxification. Essayer de voir s'il existe une généralité dans l'effet de la nature du métal sur les abeilles serait donc intéressant. Quand à l'effet sur le tube digestif, c'est à des doses proches ou supérieures à la LD50 calculée qu'a été observé un rejet des cellules mortes et une mélanisation. Ces concentrations n'étant pas retrouvées dans l'environnement, les causes de mortalité par cette voie sont donc faibles à observer sur le terrain.

Pour les larves, il semblerait que le Cu, à des concentrations environnementales, ait pour effet de stimuler le système de détoxification des larves, ce qui accélère la défécation. Cette accélération de la défécation aurait pour effet secondaire d'accélérer le moment de pupaison. Il serait donc possible que le Cu ait pour effet d'impacter la phénologie des abeilles. Il serait donc très pertinent d'aussi voir l'effet du Cd sur la défécation des larves et s'attarder plus précisément sur ce processus.

Les risques environnementaux du Cu et du Cd, même s'il semblerait au premier abord, soit inoffensifs pour les adultes, pourraient malgré tout avoir un impact sur le fitness de l'espèce, car de très faibles doses, ils pourraient accélérer la défécation des larves de bourdons. C'est pour cela qu'avoir une meilleure compréhension de leurs effets est essentiel.

Bibliographie

- Ali, Hazrat, Ezzat Khan, et Ikram Ilahi. 2019. « Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation ». *Journal of Chemistry* 2019 (mars):e6730305. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
- Al-Naggar, Yahya, Mohamed H Mona, El-Saied Naiem, et Amal I Seif. 2013. « Honey Bee Tissues as a Biomarker for Environmental Pollution with Heavy Metals. » *Delta Journal of Science* 36 (2): 38-41. <https://doi.org/10.21608/djs.2013.139633>.
- Amsalem, Etya, Christina M. Grozinger, Mario Padilla, et Abraham Hefetz. 2015. « Chapter Two - The Physiological and Genomic Bases of Bumble Bee Social Behaviour ». In *Advances in Insect Physiology*, édité par Amro Zayed et Clement F. Kent, 48:37-93. Genomics, Physiology and Behaviour of Social Insects. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2015.01.001>.
- Arena, Maria, et Fabio Sgolastra. 2014. « A Meta-Analysis Comparing the Sensitivity of Bees to Pesticides ». *Ecotoxicology* 23 (3): 324-34. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>.
- Bakr, Reda, Ahmad Kamel, Sayed Sheba, et Doaa Abdel-Haleem. 2010. « A Mathematical Model for Estimating the LC50 (or LD50) among an Insect Life Cycle ». *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology* 3 (2): 75-81. <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2010.15191>.
- Balinski, Michael A., et Ronny C. Woodruff. 2017. « Differential Sexual Survival of *Drosophila Melanogaster* on Copper Sulfate ». *Genetica* 145 (2): 131-37. <https://doi.org/10.1007/s10709-017-9951-4>.
- Ballan-Dufrançais, Christiane. 2002. « Localization of Metals in Cells of Pterygote Insects ». *Microscopy Research and Technique* 56 (6): 403-20. <https://doi.org/10.1002/jemt.10041>.
- Bednarska, A., R. Laskowski, E. Pyza, D. Semik, Z. Świątek, et O. Woźnicka. 2016. « Metal toxicokinetics and metal-driven damage to the gut of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* ». *Environmental Science and Pollution Research International* 23:22047-58. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7412-8>.
- Berenbaum, May R, et Reed M Johnson. 2015. « Xenobiotic detoxification pathways in honey bees ». *Current Opinion in Insect Science, Social Insects * Vectors and Medical and Veterinary Entomology*, 10 (août):51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>.
- Binggeli, Olivier, Claudine Neyen, Mickael Poidevin, et Bruno Lemaitre. 2014. « Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila* ». *PLOS Pathogens* 10 (5): e1004067. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004067>.
- Bloch, Guy, et Abraham Hefetz. 1999. « Regulation of Reproduction by Dominant Workers in Bumblebee (*Bombus Terrestris*) Queenright Colonies ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1007/s002650050546>.
- Braeckman, Bart, Guy Smagghe, Nathalie Brutsaert, Rita Cornelis, et Hilda Raes. 1999. « Cadmium Uptake and Defense Mechanism in Insect Cells ». *Environmental Research* 80 (3): 231-43. <https://doi.org/10.1006/enrs.1998.3897>.
- Butt, Abida, Qurat-ul-Ain, Kanwal Rehman, Muhammad Xaaceph Khan, et Thomas Hesselberg. 2018. « Bioaccumulation of Cadmium, Lead, and Zinc in Agriculture-Based Insect Food Chains ». *Environmental Monitoring and Assessment* 190 (12): 698. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7051-2>.

-
- Cadmus, Pete, Christopher J. Kotalik, Abbie L. Jefferson, Samuel H. Wheeler, Amy E. McMahon, et William H. Clements. 2020. « Size-Dependent Sensitivity of Aquatic Insects to Metals ». *Environmental Science & Technology* 54 (2): 955-64. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b04089>.
- Calow, Peter, et Valery E. Forbes. 2003. « Peer Reviewed: Does Ecotoxicology Inform Ecological Risk Assessment? » *Environmental Science & Technology* 37 (7): 146A-151A. <https://doi.org/10.1021/es0324003>.
- Carnell, Joanne D., Rosaline A. Hulse, et William O. H. Hughes. 2020. « Chapter Three - A review of nutrition in bumblebees: The effect of caste, life-stage and life history traits ». In *Advances in Insect Physiology*, édité par Russell Jurenka, 59:71-129. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.09.003>.
- Carrière, Yves. 2003. « Haplodiploidy, Sex, and the Evolution of Pesticide Resistance ». *Journal of Economic Entomology* 96 (6): 1626-40. <https://doi.org/10.1093/jee/96.6.1626>.
- Castillo, Raúl Cueva del, et Daphne J Fairbairn. 2012. « Macroevolutionary patterns of bumblebee body size: detecting the interplay between natural and sexual selection ». *Ecology and Evolution* 2 (1): 46-57. <https://doi.org/10.1002/ece3.65>.
- Cataldo, D. A., R. E. Wildung, et T. R. Garland. 1987. « Speciation of Trace Inorganic Contaminants in Plants and Bioavailability to Animals: An Overview ». *Journal of Environmental Quality* 16 (4): 289-95. <https://doi.org/10.2134/jeq1987.00472425001600040001x>.
- Cheruiyot, Dorothy J., Robert S. Boyd, Thomas A. Coudron, et Paul A. Cobine. 2013. « Biotransfer, Bioaccumulation and Effects of Herbivore Dietary Co, Cu, Ni, and Zn on Growth and Development of the Insect Predator Podisus Maculiventris (Say) ». *Journal of Chemical Ecology* 39 (6): 764-72. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0289-9>.
- Christie, Nelwyn T., M. W. Williams, et K. Bruce Jacobson. 1985. « Genetic and Physiological Parameters Associated with Cadmium Toxicity in Drosophila Melanogaster ». *Biochemical Genetics* 23 (7): 571-83. <https://doi.org/10.1007/BF00504291>.
- Clemens, Stephan, Michael G Palmgren, et Ute Krämer. 2002. « A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation ». *Trends in Plant Science* 7 (7): 309-15. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02295-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02295-1).
- Cnaani, J., R. Schmid-Hempel, et J.O. Schmidt. 2002. « Colony Development, Larval Development and Worker Reproduction in Bombus Impatiens Cresson ». *Insectes Sociaux* 49 (2): 164-70. <https://doi.org/10.1007/s00040-002-8297-8>.
- Costa, Annamaria, Mauro Veca, Maurizio Barberis, Alessandra Tosti, Giacomo Notaro, Stefano Nava, Massimo Lazzari, Alessandro Agazzi, et Francesco Maria Tangorra. 2019. « Heavy metals on honeybees indicate their concentration in the atmosphere. a proof of concept ». *Italian Journal of Animal Science* 18 (1): 309-15. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1520052>.
- Costa, Leticia Mariano da, Tatiane Caroline Grella, Rodrigo Avelaira Barbosa, Osmar Malaspina, et Roberta Cornélio Ferreira Nocelli. 2015. « Determination of Acute Lethal Doses (LD50 and LC50) of Imidacloprid for the Native Bee Melipona Scutellaris Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) ». *Sociobiology* 62 (4): 578-82. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.792>.
- Craig, Albert, Landis Hare, et André Tessier. 1999. « Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri* ». *Aquatic Toxicology* 44 (4): 255-62. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00086-1).

-
- Cuniasse, Benjamin, et Tara Glass. 2020. « Métaux lourds. Emission de gaz à effet de serre et de polluants atmosphérique en France (Rapport Secten édition 2020) ». https://www.citepa.org/wp-content/uploads/1.3-ML_2020.pdf.
- Dabour, Khaled, Yahya Al Naggar, Saad Masry, Elsaied Naiem, et John P. Giesy. 2019. « Cellular Alterations in Midgut Cells of Honey Bee Workers (*Apis Millefera* L.) Exposed to Sublethal Concentrations of CdO or PbO Nanoparticles or Their Binary Mixture ». *Science of The Total Environment* 651 (février):1356-67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.311>.
- Darriet, Philippe, Christian Poupot, J.M. Armand, Denis Dubourdiou, Michel Clerjeau, Y. Glories, Edmundo Bordeu, Philippo Tomaszewski, et Y. Bugaret. 2001. « Incidence de traitements anticryptogamiques avec des fongicides anti-mildiou, en absence de pression parasitaire, sur la composition des raisins et des vins de cabernet sauvignon », janvier.
- Darrouzet, Eric, et Bruno Corbara. 2016. « Les insectes sociaux ». Carnet de sciences. file:///home/luna/T%C3%A9chargements/extrait_les-insectes-sociaux.pdf.
- De Temmerman, L., L. Vanongeval, W. Boon, M. Hoening, et M. Geypens. 2003. « Heavy Metal Content of Arable Soils in Northern Belgium ». *Water, Air, and Soil Pollution* 148 (1): 61-76. <https://doi.org/10.1023/A:1025498629671>.
- Di, Ning, Kristen R. Hladun, Kai Zhang, Tong-Xian Liu, et John T. Trumble. 2016. « Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers ». *Chemosphere* 152 (juin):530-38. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.033>.
- Dow, Julian AT. 2017. « The essential roles of metal ions in insect homeostasis and physiology ». *Current Opinion in Insect Science*, Global change biology * Molecular physiology, 23 (octobre):43-50. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.001>.
- Egli, Dieter, Hasmik Yepiskoposyan, Anand Selvaraj, Kuppusamy Balamurugan, Rama Rajaram, Andreas Simons, Gerd Multhaup, et al. 2006. « A Family Knockout of All Four *Drosophila* Metallothioneins Reveals a Central Role in Copper Homeostasis and Detoxification ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (6): 2286-96. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2286-2296.2006>.
- Emery, Olivier, Konstantin Schmidt, et Philipp Engel. 2017. « Immune System Stimulation by the Gut Symbiont *Frischella* Perrara in the Honey Bee (*Apis Mellifera*) ». *Molecular Ecology* 26 (9): 2576-90. <https://doi.org/10.1111/mec.14058>.
- Engel, Philipp, Kelsey D. Bartlett, et Nancy A. Moran. 2015. « The Bacterium *Frischella perrara* Causes Scab Formation in the Gut of its Honeybee Host ». *mBio* 6 (3): 10.1128/mbio.00193-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00193-15>.
- Fayet, Agnès. 2012. « Eusocialité et superorganisme ». *abeille & cie*. https://www.cari.be/IMG/pdf/148_biologie.pdf.
- Feldhaar, Heike, et Oliver Otti. 2020. « Pollutants and Their Interaction with Diseases of Social Hymenoptera ». *Insects* 11 (3): 153. <https://doi.org/10.3390/insects11030153>.
- Filshie, B. K., D. F. Poulson, et D. F. Waterhouse. 1971. « Ultrastructure of the copper-accumulating region of the *Drosophila* larval midgut ». *Tissue and Cell* 3 (1): 77-102. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(71\)80033-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(71)80033-2).
- Folwell, James L., C. Howard Barton, et David Shepherd. 2006. « Immunolocalisation of the *D. melanogaster* Nramp homologue Malvolio to gut and Malpighian tubules provides evidence that

-
- Malvolio and Nramp2 are orthologous ». *Journal of Experimental Biology* 209 (10): 1988-95. <https://doi.org/10.1242/jeb.02193>.
- Formicki, Grzegorz, Agnieszka Greń, Robert Stawarz, Bartłomiej Zyśk, et Anna Gał. 2013. « Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring ». <https://www.pjoes.com/Metal-Content-in-Honey-Propolis-Wax-r-nand-Bee-Pollen-and-Implications-for-Metal,88957,0,2.html>.
- Foster, Robin L., Ameilia Brunskill, David Verdirame, et Sean O'Donnell. 2004. « Reproductive Physiology, Dominance Interactions, and Division of Labour among Bumble Bee Workers ». *Physiological Entomology* 29 (4): 327-34. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.00388.x>.
- Friedli, Andrea, Geoffrey R. Williams, Selina Bruckner, Peter Neumann, et Lars Straub. 2020. « The weakest link: Haploid honey bees are more susceptible to neonicotinoid insecticides ». *Chemosphere* 242 (mars):125145. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125145>.
- Garric, Jeanne. 2009. « La démarche écotoxicologique : pour la protection et l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques : Synthèse des échanges ». Zone Atelier Bassin du Rhône (ZABR). https://www.graie.org/graie/graiedoc/doc_telech/actesynttheses/zabrJT5actes.pdf.
- Gekièrè, Antoine, Maryse Vanderplanck, et Denis Michez. 2023. « Trace Metals with Heavy Consequences on Bees: A Comprehensive Review ». *Science of The Total Environment* 895 (octobre):165084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165084>.
- Goff, F Le, et V Bonnomet. 2004. « Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM », 87.
- González-Santoyo, Isaac, et Alex Córdoba-Aguilar. 2012a. « Phenoloxidase: A Key Component of the Insect Immune System ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>.
- . 2012b. « Phenoloxidase: A Key Component of the Insect Immune System ». *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>.
- Gradish, Angela E, Jozef van der Steen, Cynthia D Scott-Dupree, Ana R Cabrera, G Christopher Cutler, Dave Goulson, Olaf Klein, et al. 2019a. « Comparison of Pesticide Exposure in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) and Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae): Implications for Risk Assessments ». *Environmental Entomology* 48 (1): 12-21. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy168>.
- . 2019b. « Comparison of Pesticide Exposure in Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) and Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae): Implications for Risk Assessments ». *Environmental Entomology* 48 (1): 12-21. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy168>.
- Halmenschelager, Paula Tais, et João Batista Teixeira da Rocha. 2019. « Biochemical CuSO₄ Toxicity in *Drosophila Melanogaster* Depends on Sex and Developmental Stage of Exposure ». *Biological Trace Element Research* 189 (2): 574-85. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1475-y>.
- Heliövaara, Kari, et Rauno Väisänen. 1990. « Concentrations of Heavy Metals in the Food, Faeces, Adults, and Empty Cocoons of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera, Diprionidae) ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45 (1): 13-18. <https://doi.org/10.1007/BF01701822>.
- Hendriksma, Harmen P., Stephan Härtel, et Ingolf Steffan-Dewenter. 2011. « Honey Bee Risk Assessment: New Approaches for in Vitro Larvae Rearing and Data Analyses ». *Methods in Ecology and Evolution* 2 (5): 509-17. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00099.x>.

-
- Henkler, Frank, Brinkmann Joep, et Andreas Luch. 2010. « The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis Induced by Metals and Xenobiotics ». *Cancers* 2 (juin):376-96. <https://doi.org/10.3390/cancers2020376>.
- Hepburn, H. R. 1986. « Pollen and Wax Production ». In *Honeybees and Wax: An Experimental Natural History*, édité par H. R. Hepburn, 139-44. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71458-0_12.
- Hladun, Kristen R., Ning Di, Tong-Xian Liu, et John T. Trumble. 2016. « Metal Contaminant Accumulation in the Hive: Consequences for Whole-colony Health and Brood Production in the Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 35 (2): 322-29. <https://doi.org/10.1002/etc.3273>.
- Hladun, Kristen R., David R. Parker, et John T. Trumble. 2015. « Cadmium, Copper, and Lead Accumulation and Bioconcentration in the Vegetative and Reproductive Organs of *Raphanus Sativus*: Implications for Plant Performance and Pollination ». *Journal of Chemical Ecology* 41 (4): 386-95. <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0569-7>.
- Hogeweg, P., et B. Hesper. 1983. « The Ontogeny of the Interaction Structure in Bumble Bee Colonies: A MIRROR Model ». *Behavioral Ecology and Sociobiology* 12 (4): 271-83. <https://doi.org/10.1007/BF00302895>.
- Holland, Jacob G., et Andrew F. G. Bourke. 2015. « Colony and Individual Life-History Responses to Temperature in a Social Insect Pollinator ». *Functional Ecology* 29 (9): 1209-17. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12480>.
- Jaishankar, Monisha, Tenzin Tseten, Naresh Anbalagan, Blessy B. Mathew, et Krishnamurthy N. Beeregowda. 2014. « Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals ». *Interdisciplinary Toxicology* 7 (2): 60-72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- Kalbande, D. M., Sharda N. Dhadse, P. R. Chaudhari, et S. R. Wate. 2008. « Biomonitoring of Heavy Metals by Pollen in Urban Environment ». *Environmental Monitoring and Assessment* 138 (1): 233-38. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9793-0>.
- Kato, Yuto, Shingo Kikuta, Seth M. Barribeau, et Maki N. Inoue. 2022. « In Vitro Larval Rearing Method of Eusocial Bumblebee *Bombus Terrestris* for Toxicity Test ». *Scientific Reports* 12 (1): 15783. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19965-0>.
- Khan, Subhanullah, et Minglin Lang. 2023. « A Comprehensive Review on the Roles of Metals Mediating Insect–Microbial Pathogen Interactions ». *Metabolites* 13 (7): 839. <https://doi.org/10.3390/metabo13070839>.
- Kim, Jong-Joo, You-Sam Kim, et Vijay Kumar. 2019. « Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies ». *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 54 (juillet):226-31. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>.
- Koo, Jamin. 2023. « Cell-Free Protein Synthesis of Metalloproteins ». In *Cell-Free Macromolecular Synthesis*, édité par Yuan Lu et Michael C. Jewett, 47-58. Cham: Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/10_2023_233.
- Krantzberg, G., et P. M. Stokes. 1990. « Metal Concentrations and Tissues Distribution in Larvae of *Chironomus* with Reference to X-Ray Microprobe Analysis ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19 (1): 84-93. <https://doi.org/10.1007/BF01059816>.
- Kraus, F. B., S. Wolf, et R. F. A. Moritz. 2009. « Male Flight Distance and Population Substructure in the Bumblebee *Bombus Terrestris* ». *Journal of Animal Ecology* 78 (1): 247-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01479.x>.

-
- Ladomersky, Erik, et Michael J Petris. 2015. « Copper tolerance and virulence in bacteria ». *Metallomics* 7 (6): 957-64. <https://doi.org/10.1039/c4mt00327f>.
- Lauverjat, Sylvie, Christiane Ballan-Dufrançais, et Maurice Wegnez. 1989. « Detoxification of Cadmium: Ultrastructural Study and Electron-Probe Microanalysis of the Midgut in a Cadmium-Resistant Strain of *Drosophila Melanogaster* », 11.
- Le Bouil, Anne, Martine Avenel-Audran, Anne-Marie Bourgeais, Jean-Luc Verret, et Pierre Allain. 2001. « Intoxication chronique à l'arsenic ». *Annales de Toxicologie Analytique* 13 (3): 182-85. <https://doi.org/10.1051/ata/2001013>.
- LeBuhn, Gretchen, et Joshua Vargas Luna. 2021. « Pollinator decline: what do we know about the drivers of solitary bee declines? » *Current Opinion in Insect Science*, Special Section on Pollinator decline: human and policy dimensions * Social insects, 46 (août):106-11. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.05.004>.
- Leita, L., G. Muhlbachova, S. Cesco, R. Barbattini, et C. Mondini. 1996. « Investigation of the Use of Honey Bees and Honey Bee Products to Assess Heavy Metals Contamination ». *Environmental Monitoring and Assessment* 43 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00399566>.
- Leonard, Erin M., Laura M. Pierce, Patricia L. Gillis, Chris M. Wood, et Michael J. O'Donnell. 2009. « Cadmium transport by the gut and Malpighian tubules of *Chironomus riparius* ». *Aquatic Toxicology* 92 (3): 179-86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.011>.
- Liu, Yaoming, Haihua Wu, Lihua Kou, Xiaojian Liu, Jianzhen Zhang, Yaping Guo, et Enbo Ma. 2014. « Two Metallothionein Genes in *Oxya Chinensis*: Molecular Characteristics, Expression Patterns and Roles in Heavy Metal Stress ». *PLOS ONE* 9 (11): e112759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112759>.
- Lu, Guanghua, Hao Wu, et Jiannan Ding. 2018. « Interactive Effects of Copper, Fluorene, and Fluoranthene on Enzymatic Biomarkers and Metallothionein Levels in Crucian Carp (*Carassius Auratus*) ». *Polish Journal of Environmental Studies* 27 (1): 183-90. <https://doi.org/10.15244/pjoes/75809>.
- Mann, Reinier, Martina Vijver, et Willie Peijnenburg. 2011. « Metals and Metalloids in Terrestrial Systems: Bioaccumulation, Biomagnification and Subsequent Adverse Effects ». In *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 43-62. <https://doi.org/10.2174/978160805121210043>.
- Matech, F, F Zaakour, K Moustarhfer, Z Chemsy, I Benazzouz, et N Saber. 2014. « CONCENTRATIONS EN ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES DANS LES SOLS IRRIGUÉS PAR LES EAUX USÉES VERSÉES DANS L'OUED MERZEG (CASABLANCA –MAROC) ».
- Midway, Stephen, Matthew Robertson, Shane Flinn, et Michael Kaller. 2020. « Comparing multiple comparisons: practical guidance for choosing the best multiple comparisons test ». *PeerJ* 8 (décembre):e10387. <https://doi.org/10.7717/peerj.10387>.
- Miller, Jeffrey C. 1993. « Insect Natural History, Multi-Species Interactions and Biodiversity in Ecosystems ». *Biodiversity & Conservation* 2 (3): 233-41. <https://doi.org/10.1007/BF00056670>.
- Missirlis, Fanis, et Pedro L Oliveira. 2022. « Metal Ions in the Physiology of Insects ». *Current Opinion in Insect Science* 54 (décembre):100965. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2022.100965>.
- Monchanin, Coline, Erwann Drujont, Jean-Marc Devaud, Mathieu Lihoreau, et Andrew B. Barron. 2021. « Metal pollutants have additive negative effects on honey bee cognition ». *Journal of Experimental Biology* 224 (12): jeb241869. <https://doi.org/10.1242/jeb.241869>.

-
- Moroń, Dawid, Irena M. Grześ, Piotr Skórka, Hajnalka Szentgyörgyi, Ryszard Laskowski, Simon G. Potts, et Michał Woyciechowski. 2012. « Abundance and Diversity of Wild Bees along Gradients of Heavy Metal Pollution ». *Journal of Applied Ecology* 49 (1): 118-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02079.x>.
- Nation, James. 2016. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. 3e edition. Taylor & Francis Group.
- Navarro, Juan A., et Stephan Schneuwly. 2017. « Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila Melanogaster* ». *Frontiers in Genetics* 8 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00223>.
- O'Donnell, Sean, et Samuel N Beshers. 2004. « The Role of Male Disease Susceptibility in the Evolution of Haplodiploid Insect Societies ». *Proceedings Biological Sciences* 271 (1542): 979-83. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2685>.
- OECD. 2024. « OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS BUMBLEBEE, ACUTE ORAL TOXICITY TEST ». <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264284128-en.pdf?expires=1711554513&id=id&accname=guest&checksum=A6A324AE8E8C8A1CEA0C2CA999363B49>.
- Pereboom, J.J.M. 2000. « The Composition of Larval Food and the Significance of Exocrine Secretions in the Bumblebee *Bombus Terrestris* ». *Insectes Sociaux* 47 (1): 11-20. <https://doi.org/10.1007/s000400050003>.
- Pillai, S. K., K. Kobayashi, M. Michael, T. Mathai, B. Sivakumar, et P. Sadasivan. 2021. « John William Trevan's Concept of Median Lethal Dose (LD50/LC50) – More Misused than Used ». *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research* 15 (3). <https://doi.org/10.26444/jpccr/139588>.
- Polidori, Carlo, Agustín Pastor, Alberto Jorge, et José Pertusa. 2018. « Ultrastructural Alterations of Midgut Epithelium, But Not Greater Wing Fluctuating Asymmetry, in Paper Wasps (*Polistes Dominula*) from Urban Environments ». *Microscopy and Microanalysis* 24 (2): 183-92. <https://doi.org/10.1017/S1431927618000107>.
- Poteat, Monica D., et David B. Buchwalter. 2014. « Calcium uptake in aquatic insects: influences of phylogeny and metals (Cd and Zn) ». *Journal of Experimental Biology* 217 (7): 1180-86. <https://doi.org/10.1242/jeb.097261>.
- Potts, Simon G., Hien T. Ngo, Jacobus C. Biesmeijer, Thomas D. Breeze, Lynn V. Dicks, Lucas A. Garibaldi, Rosemary Hill, Josef Settele, et Adam Vanbergen. 2016. « The Assessment Report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on Pollinators, Pollination and Food Production ». Publication - Report. Bonn, Germany: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. 2016. https://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual_chapters_pollination_20170305.pdf.
- Pozo, María I., Gaby van Kemenade, Annette van Oystaeyen, Tomás Aledón-Catalá, Alfredo Benavente, Wim Van den Ende, Felix Wäckers, et Hans Jacquemyn. 2020. « The Impact of Yeast Presence in Nectar on Bumble Bee Behavior and Fitness ». *Ecological Monographs* 90 (1): e01393. <https://doi.org/10.1002/ecm.1393>.
- Rashid, Abdur, Brian Schutte, April Ulery, Michael Deyholos, Soum Sanogo, Erik Lehnhoff, et Leslie Beck. 2023. *Heavy Metal Contamination in Agricultural Soil: Environmental Pollutants Affecting Crop Health*. <https://doi.org/10.20944/preprints202305.0398.v1>.

-
- Rasmont, Pierre, Audrey Coppee, Denis Michez, et Thibaut De Meulemeester. 2008. « An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae) ». *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* 44 (2): 243-50. <https://doi.org/10.1080/00379271.2008.10697559>.
- Rayms-Keller, A., K. E. Olson, M. McGaw, C. Oray, J. O. Carlson, et B. J. Beaty. 1998. « Effect of Heavy Metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39 (1): 41-47. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1605>.
- Richardson, Jeanne, et Stephanie Bopp. 2012. « Compilation of a Database on Ecotoxicological Properties of Active Substances and Plant Protection Products ». *EFSA Supporting Publications* 9 (12): 364E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2012.EN-364>.
- Ritz, Christian, Florent Baty, Jens C. Streibig, et Daniel Gerhard. 2015. « Dose-Response Analysis Using R ». *PLOS ONE* 10 (12): e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.
- Rottler, Ann-Marie, Stefan Schulz, et Manfred Ayasse. 2013. « Wax Lipids Signal Nest Identity in Bumblebee Colonies ». *Journal of Chemical Ecology* 39 (1): 67-75. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0229-0>.
- Ryu, Doug-Young, Sung-Ja Lee, Duk Woong Park, Byung-Sun Choi, Curtis D Klaassen, et Jung-Duck Park. 2004. « Dietary iron regulates intestinal cadmium absorption through iron transporters in rats ». *Toxicology Letters* 152 (1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.03.015>.
- Sánchez-Bayo, Francisco. 2021. « Indirect Effect of Pesticides on Insects and Other Arthropods ». *Toxics* 9 (8): 177. <https://doi.org/10.3390/toxics9080177>.
- Sarker, Aniruddha, Jang-Eok Kim, Abu Reza Md. Towfiqul Islam, Muhammad Bilal, Md. Refat Jahan Rakib, Rakhi Nandi, Mohammed M. Rahman, et Tofazzal Islam. 2022. « Heavy Metals Contamination and Associated Health Risks in Food Webs—a Review Focuses on Food Safety and Environmental Sustainability in Bangladesh ». *Environmental Science and Pollution Research* 29 (3): 3230-45. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17153-7>.
- Scott, Sarah B., Roman Lanno, et Mary M. Gardiner. 2024. « Acute toxicity and bioaccumulation of common urban metals in *Bombus impatiens* life stages ». *Science of The Total Environment* 915 (mars):169997. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.169997>.
- Shirley, Mark D. F., et Richard M. Sibly. 1999. « GENETIC BASIS OF A BETWEEN-ENVIRONMENT TRADE-OFF INVOLVING RESISTANCE TO CADMIUM IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* ». *Evolution* 53 (3): 826-36. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05376.x>.
- Shulman, Marija V., Olexandr Y. Pakhomov, et Viktor V. Brygadyrenko. 2017. « Effect of Lead and Cadmium Ions upon the Pupariation and Morphological Changes in *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) ». *Folia Oecologica* 44 (1): 28-37. <https://doi.org/10.1515/foecol-2017-0004>.
- Skaldina, Oksana, et Jouni Sorvari. 2019. « Ecotoxicological Effects of Heavy Metal Pollution on Economically Important Terrestrial Insects ». In *Networking of Mutagens in Environmental Toxicology*, édité par Kavindra Kumar Kesari, 137-44. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96511-6_7.
- Skorupski, Peter, Thomas F. Döring, et Lars Chittka. 2007. « Photoreceptor Spectral Sensitivity in Island and Mainland Populations of the Bumblebee, *Bombus terrestris* ». *Journal of Comparative Physiology A* 193 (5): 485-94. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0206-6>.
- Sparks, Donald L. 2005. « Toxic Metals in the Environment: The Role of Surfaces ». *Elements* 1 (4): 193-97. <https://doi.org/10.2113/gselements.1.4.193>.

-
- Stabler, Daniel, Pier P. Paoli, Susan W. Nicolson, et Geraldine A. Wright. 2015. « Nutrient Balancing of the Adult Worker Bumblebee (*Bombus Terrestris*) Depends on the Dietary Source of Essential Amino Acids ». *Journal of Experimental Biology* 218 (5): 793-802.
<https://doi.org/10.1242/jeb.114249>.
- Straalen, Nico M. van, et Dick Roelofs. 2005. « Cadmium tolerance in a soil arthropod - a model of real-time microevolution ». *Entomologische Berichten* 65 (janvier):105-11.
- Strobl, Verena, Matthias Albrecht, Laura Villamar-Bouza, Simone Tosi, Peter Neumann, et Lars Straub. 2021. « The Neonicotinoid Thiamethoxam Impairs Male Fertility in Solitary Bees, *Osmia Cornuta* ». *Environmental Pollution* 284 (septembre):117106.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117106>.
- Tepedino, V. J., et F. D. Parker. 1982. « Interspecific Differences in the Relative Importance of Pollen and Nectar to Bee Species Foraging on Sunflowers ». *Environmental Entomology* 11 (1): 246-50. <https://doi.org/10.1093/ee/11.1.246>.
- Thakur, Meena. 2012. « Bees as Pollinators – Biodiversity and Conservation », janvier.
- Therneau, Terry. 2024. « A Package for Survival Analysis in R », avril, 100.
- thomash. 2014. « Classifieur des données non-paramétriques : le test de Dunn ». Billet. *Les goûters de la géomatique* (blog). 27 mars 2014. <https://doi.org/10.58079/p3sp>.
- Tian, Li, et Heather M. Hines. 2018. « Morphological Characterization and Staging of Bumble Bee Pupae ». *PeerJ* 6 (décembre):e6089. <https://doi.org/10.7717/peerj.6089>.
- Tibbett, Mark, Iain Green, Andrew Rate, Vinícius H. De Oliveira, et Jeanette Whitaker. 2021. « The transfer of trace metals in the soil-plant-arthropod system ». *Science of The Total Environment* 779 (juillet):146260. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146260>.
- Urbini, A., E. Sparvoli, et S. Turillazzi. 2006. « Social paper wasps as bioindicators: a preliminary research with *Polistes dominulus* (Hymenoptera Vespidae) as a trace metal accumulator ». *Chemosphere* 64 (5): 697-703. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.009>.
- Valko, M., H. Morris, et M. Cronin. 2005. « Metals, Toxicity and Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161-1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>.
- Van den Toorn, H.W.P, et J.J.M Pereboom. 1996. « Determination of Larval Instar in Bumblebees (Hymenoptera: Apidae) by Using the Head Capsule Width ». *proc.exper & appl. entomol. NEV amsterdam*.
- Van der Steen, Jozef, Ivo Roessink, Muo Kasina, Mary Gikungu, et Roberta Nocelli. 2012. « Is the European honeybee (*Apis mellifera mellifera*) a good representative for other pollinator species? ». *Julius-Kühn-Archiv*, octobre. <https://doi.org/10.5073/jka.2012.437.047>.
- Vandenbulcke, Franck, Claire Grelle, Marie-Chantal Fabre, et Michel Descamps. 1998. « Implication of the Midgut of the Centipede *Lithobius forficatus* in the Heavy Metal Detoxification Process ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41 (3): 258-68.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1706>.
- Vanderplanck, M., R. Moerman, P. Rasmont, G. Lognay, B. Wathelet, R. Wattiez, et D. Michez. 2014. « How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? ». *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086209>.
- Violante, A., V. Cozzolino, L. Perelomov, A. G. Caporale, et M. Pigna. 2010. « MOBILITY AND BIOAVAILABILITY OF HEAVY METALS AND METALLOIDS IN SOIL ENVIRONMENTS ». *Journal of soil science and plant nutrition* 10 (3): 268-92.
<https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100005>.

-
- Wäckers, Felix L., Jesús Sánchez Alberola, Ferran Garcia-Marí, et Apostolos Pekas. 2017. « Attract and distract: Manipulation of a food-mediated protective mutualism enhances natural pest control ». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 246 (août):168-74. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.037>.
- Wang, Lihao, Jie Wu, Kai Li, Ben M. Sadd, Yulong Guo, Daohua Zhuang, Zhengyi Zhang, et al. 2019a. « Dynamic Changes of Gut Microbial Communities of Bumble Bee Queens through Important Life Stages ». *mSystems* 4 (6): 10.1128/msystems.00631-19. <https://doi.org/10.1128/msystems.00631-19>.
- . 2019b. « Dynamic Changes of Gut Microbial Communities of Bumble Bee Queens through Important Life Stages ». *mSystems* 4 (6): 10.1128/msystems.00631-19. <https://doi.org/10.1128/msystems.00631-19>.
- Wang, Xiaoyun, Qiao Gao, Xinhui Liu, Xiao-Ping Wang, Chaoliang Lei, Waheed A. A. Sayed, et Fen Zhu. 2018. « Metallothionein in *Hermetia Illucens* (Linnaeus, 1758) Larvae (Diptera: Stratiomyidae), a Potential Biomarker for Organic Waste System ». *Environmental Science and Pollution Research* 25 (6): 5379-85. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0856-7>.
- Weiss, Martha R. 2006. « DEFECATION BEHAVIOR AND ECOLOGY OF INSECTS ». *Annual Review of Entomology* 51 (Volume 51, 2006): 635-61. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123212>.
- Wright, Robert O., et Andrea Baccarelli. 2007. « Metals and Neurotoxicology », *The Journal of Nutrition* 137 (12): 2809-13. <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2809>.
- Xiao, Guiran, Zhihui Wan, Qiangwang Fan, Xiaona Tang, et Bing Zhou. 2014. « The metal transporter ZIP13 supplies iron into the secretory pathway in *Drosophila melanogaster* ». Édité par Randy Schekman. *eLife* 3 (juillet):e03191. <https://doi.org/10.7554/eLife.03191>.
- Xun, Erna, Yanwen Zhang, Jimin Zhao, et Jixun Guo. 2017. « Translocation of heavy metals from soils into floral organs and rewards of *Cucurbita pepo*: Implications for plant reproductive fitness ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145 (novembre):235-43. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.045>.
- Yan, An, Yamin Wang, Swee Ngim Tan, Mohamed Lokman Mohd Yusof, Subhadip Ghosh, et Zhong Chen. 2020. « Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land ». *Frontiers in Plant Science* 11 (avril). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>.
- Yiwen, Wang, Tian Xiaohan, Zhu Chunfeng, Yu Xiaoyu, Miao Yaodong, et Qiao Huanhuan. 2022. « Genetics of metallothioneins in *Drosophila melanogaster* ». *Chemosphere* 288 (février):132562. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132562>.
- Zhang, Qiaochu, et Chengchen Wang. 2020. « Natural and Human Factors Affect the Distribution of Soil Heavy Metal Pollution: A Review ». *Water, Air, & Soil Pollution* 231 (7): 350. <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04728-2>.
- Zhou, Hao, Ken M. Cadigan, et Dennis J. Thiele. 2003. « A Copper-Regulated Transporter Required for Copper Acquisition, Pigmentation, and Specific Stages of Development in *Drosophila Melanogaster** ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 48210-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309820200>.
- Ziller, Antoine, et Laurence Fraissinet-Tachet. 2018. « Metallothionein Diversity and Distribution in the Tree of Life: A Multifunctional Protein ». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 10 (11): 1549-59. <https://doi.org/10.1039/c8mt00165k>.