

Université de Mons
Faculté des Sciences
Département de Biologie
SERVICE DE ZOOLOGIE

**Toxicité d'une exposition environnementale au
dibutyle phtalate et au di-2-éthylhexyle phtalate
sur *Bombus terrestris* L.**

Promoteur : Denis Michez
Co-promotrice : Justine Dewaele
Mémorante : Audrey Pinchon

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade légal de Master en
Biologie des organismes et écologie

Année académique 2023-2024



Université de Mons
Faculté des Sciences
Département de Biologie
SERVICE DE ZOOLOGIE

**Toxicité d'une exposition environnementale au
dibutyle phtalate et au di-2-éthylhexyle phtalate
sur *Bombus terrestris* L.**

Promoteur : Denis Michez
Co-promotrice : Justine Dewaele
Mémorante : Audrey Pinchon

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade légal de Master en
Biologie des organismes et écologie

Année académique 2023-2024



L'auteur, Pinchon Audrey, atteste avoir respecté les règles éthiques en vigueur, y compris la charte de l'Université relative à l'utilisation de l'Intelligence Artificielle

Remerciements

Je voudrais avant toute chose remercier de nombreuses personnes pour la finalisation de mon master de biologie et de ce mémoire, des soutiens précieux sans qui tout cela n'aurait pas été possible.

En premier lieu, je voudrais remercier le Professeur Denis Michez de m'avoir accueillie dans le laboratoire de Zoologie pour que je puisse étudier les phtalates auprès de la doctorante Justine Dewaele. Je tiens également à remercier profondément cette dernière qui m'a aidée à réaliser ce mémoire, malgré la distance. Sa bienveillance et la pertinence de ses conseils ne se sont jamais démenties tout au long de ce travail de fin d'étude.

Je remercie également profondément Dimitri Evrard, Laetitia Verdy et Manon Fievet de m'avoir aidée pour la mise en cage des bourdons et pour les expositions. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire de zoologie ainsi que les aides extérieures au laboratoire de m'avoir aidée pour les dissections des microcolonies, sans quoi ces dissections auraient sûrement duré des journées entières.

Je tiens également à remercier ma famille pour m'avoir soutenue dans ce choix d'étude jusqu'au bout. Sans elle, je ne serais pas arrivée jusqu'ici aujourd'hui.

Merci à mon copain Scott Crabbé de m'avoir soutenue du début à la fin de mes études, surtout dans les moments les plus difficiles. Merci également de m'avoir aidée pour certaines manipulations, l'encodage des données et bien d'autres choses. Merci pour tous ces encouragements, cette patience, cette confiance en moi et surtout cet amour, dans les meilleurs moments comme dans ceux qui n'étaient pas faciles. Merci également pour tous les moments qui m'ont permis de me déconnecter de l'université.

Je remercie enfin mes amis, biologistes et non biologistes pour tous ces moments passés à leurs côtés. Ces études m'ont amenée à découvrir des personnes incroyables. Je remercie Lise Van Espen, Louanne Degallaix pour ces 5 années précieuses. Merci à mon ami Lucas Ponchaut pour sa bonne humeur et son humour durant ces années de Master. Je remercie également Coline Blancquart, pour ces balades, soirées, qui m'ont permis de me changer les idées et de profiter.

Merci à vous tous et à vous toutes.

Résumé

Les villes sont des environnements qui attirent de plus en plus de pollinisateurs sauvages. Toutefois, ces villes sont soumises à de nombreuses contraintes environnementales telles que la fragmentation de l'habitat, les polluants présents dans l'air ainsi que le sol, *etc.* Parmi ces polluants urbains se trouvent les gaz d'échappement, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les phtalates et bien d'autres. Les phtalates sont des polluants anthropiques rejetés depuis quelques décennies dans l'environnement en quantités importantes. Ils peuvent avoir des effets néfastes sur la faune et la flore du monde entier. Ils sont connus en tant que perturbateurs endocriniens chez les vertébrés et les invertébrés. Cela implique que ces phtalates peuvent altérer la physiologie et le métabolisme des insectes, notamment chez les abeilles sauvages. Ils peuvent dérégler la voie de signalisation des ecdystéroïdes, importante dans le contrôle de la mue et la métamorphose des abeilles, mais aussi impacter l'olfaction, qui est utile dans la communication entre individus et dans l'interaction plante – pollinisateur.

Nous avons investigué l'impact de deux phtalates, le dibutyle phtalate (DnBP) et le di-2-éthylhexyle phtalate (DEHP), à doses environnementales sur les abeilles en utilisant *Bombus terrestris* comme espèce modèle. Ces phtalates à doses environnementales ont été étudiés seuls et en mélange. L'étude s'est divisée en deux expériences : une exposition aiguë par application de contact sur des ouvrières placées dans des conditions d'élevage individuelles, et une exposition chronique par application de contact sur des ouvrières placées en microcolonies de 10 ouvrières. Les microcolonies ont été élevées durant 35 jours et les ouvrières des deux conditions d'élevage ont été nourries *ad libitum*. L'impact des différents traitements sur les ouvrières de *Bombus terrestris* a été étudié en analysant le taux de mortalité dans les deux conditions d'élevage et en analysant la consommation de nourriture des microcolonies, leur production de larves et la masse de ces dernières en conditions d'élevage sociales.

Les résultats obtenus indiquent que le DnBP, en conditions d'élevage individuelles, induit un taux de survie des ouvrières diminué à une dose de 60 ng/g b.w et à 600 ng/g b.w. Une dose mixte de phtalates (DnBP 600 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w) provoque un taux de mortalité significativement plus élevé des ouvrières exposées par rapport au contrôle. Cependant, toutes les doses de phtalates testées n'affectent pas le taux de survie des microcolonies. Elles n'affectent pas non plus le nombre de larves produites mais certains traitements tels que le DnBP 60 ng/g b.w, le DnBP 600 ng/g b.w et le mélange de DnBP 60 & DEHP 120 ng/g b.w augmentent la masse des individus des stades larvaires intermédiaires.

Mots clés : Insectes, *Bombus terrestris*, phtalates, DnBP, DEHP, perturbateurs endocriniens, mortalité, développement.

Summary

Cities are environments that are attracting more and more wild pollinators. However, these cities are subject to numerous environmental constraints, such as habitat fragmentation, air and soil pollutants, and so on. These urban pollutants include exhaust fumes, polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates and many others. Phthalates are anthropic pollutants that have been released into the environment in large quantities for decades. They can have harmful effects on flora and fauna around the world. They are known to be endocrine disruptors in vertebrates and invertebrates. As endocrine disruptors, phthalates can alter the physiology and metabolism of insects, particularly wild bees. They can deregulate the ecdysteroid signalling pathway, which is important in controlling moulting and metamorphosis of bees, and also have an impact on olfaction, which is useful for communication between individuals and in plant-pollinator interaction.

We investigated the impact of two phthalates, dibutyl phthalate (DnBP) and di-2-ethylhexylphthalate (DEHP), at environmental doses on bees using *Bombus terrestris* as model species. These phthalates at environmental doses were studied alone and in mixture. The study was divided into two experiments: acute exposure by contact application to workers places in individual rearing conditions, and chronic exposure by contact application to workers places in microcolonies of 10 workers. The microcolonies were reared for 35 days and the workers of the two rearing conditions were fed *ad libitum*. The impact of the different treatments on *Bombus terrestris* workers was studied by analysing the mortality rate in the two rearing conditions and by analysing the food consumption of the microcolonies, their larvae production and the weight of these larvae produced under social rearing conditions.

The results obtained indicate that DnBP, under individual rearing conditions, induces a reduced survival rate in workers at a dose of 60 ng/ g b.w and at 600 ng/g b.w. A mixed dose of phthalates (DnBP 600 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w) caused a significantly higher mortality rate in exposed workers compared with the control. However, all the doses of phthalates tested did not affect the survival rate of microcolonies. They also did not affect the number of larvae produced, but some treatments such as DnBP 60 ng/g b.w, DnBP 600 ng/g b.w and the mixture of DnBP 60 and DEHP 120 ng/g b.w increased the weight of individuals of intermediate larval stages.

Key words: Insects, *Bombus terrestris*, phthalates, DnBP, DEHP, endocrine disruptors, mortality, development.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Abréviations	ix
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1. Les abeilles	1
1.1.1. Socialité et relations intra-spécifiques.....	1
1.1.2. Relations plantes-pollinisateurs	2
1.1.3. Déclin.....	3
1.2. Les phtalates	4
1.2.1. Définition, source et utilisation.....	4
1.2.2. Pollution aux phtalates dans l'environnement	6
1.2.3. Impacts des phtalates sur les organismes	8
1.3. Impacts des phtalates sur les abeilles sauvages.....	11
Chapitre 2 : Objectifs du mémoire et hypothèses de départ.....	13
Chapitre 3 : Matériel et méthodes	14
3.1. Modèle biologique étudié : <i>Bombus terrestris</i>	14
3.2. Molécules étudiées et concentrations.....	15
3.3. Dispositifs expérimentaux.....	17
3.3.1. Exposition de contact individuelle des ouvrières.....	17
3.3.1.1. Installation et maintien	17
3.3.1.2. Exposition topicale aigüe.....	18
3.3.1.3. Paramètre mesuré : analyse de la mortalité.....	21
3.3.2. Exposition de contact en microcolonies	21
3.3.2.1. Installation et maintien des microcolonies.....	21
3.3.2.2. Exposition par application topique et chronique	23
3.3.2.3. Consommation de sirop et de pollen d'aubépine	24
3.3.2.4. Paramètres mesurés	25

3.5. Analyses statistiques	27
3.5.1. Analyse de la mortalité à l'échelle individuelle.....	27
3.5.2. À l'échelle coloniale	28
3.5.2.1. Mortalité.....	28
3.5.2.2. Production des microcolonies et consommation des ressources	28
Chapitre 4 : Résultats.....	29
4.1. Mortalité à l'échelle individuelle	29
4.1.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle	30
4.1.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle.....	31
4.1.3. Effet des phtalates combinés sur la mortalité individuelle	33
4.2. À l'échelle coloniale	33
4.2.1. Mortalité.....	33
4.2.2. Production du couvain.....	35
4.2.2.1. Effets des traitements sur le nombre d'individus produits.....	35
4.2.2.2. Effets des traitements sur la masse du couvain et des individus	36
4.2.3. Consommation des ressources.....	40
Chapitre 5 : Discussion des résultats.....	42
5.1. Mortalité à l'échelle individuelle	42
5.1.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle	42
5.1.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle.....	43
5.1.3. Effet des phtalates combinés sur la mortalité individuelle	44
5.2. À l'échelle coloniale	45
5.2.1. Mortalité.....	45
5.2.2. Production du couvain.....	46
5.2.2.1. Effets des traitements sur le nombre d'individus produits.....	46
5.2.2.2. Effets des traitements sur la masse du couvain et des individus	47
5.2.3. Consommation des ressources.....	49
5.3. Perspectives	50
5.4. Conclusions générales.....	52
Références	I

Annexes	XVII
7.1. Annexe 1 : expériences préliminaires.....	XVII
7.1.1. Expérience par application topique au diméthoate	XVII
7.1.1.1. Matériels et méthodes.....	XVII
7.1.1.2. Résultats et discussion.....	XVII
7.1.2. Exposition par application topique à l'acétone pur	XVIII
7.1.2.1. Matériels et méthodes.....	XVIII
7.1.2.2. Résultats et discussion.....	XIX
7.2. Annexe 2 : protocole des expositions d'ouvrières de <i>B. terrestris</i> au DnBP et DEHP effectuées en 2022 au Laboratoire EEP UMR 8198, Lille	XIX
7.2.1. Préparation des traitements.....	XIX
7.2.2. Design expérimental	XX
7.3. Annexe 3 : courbe de survie en microcolonie après 72 heures	XXI
7.4. Annexe 4 : résultats des effets des phtalates sur la mortalité en conditions isolées	XXII
7.4.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle	XXIII
7.4.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle.....	XXIV

Abréviations

BBP :	Phtalate de benzyle et de butyle
COVa :	Composés organiques volatils d'origine anthropique
COVs	Composés organiques volatils
DEHP :	Di-2-éthylhexyle phtalate
DEP :	Diéthyle phtalate
DBP ou DnBP :	Dibutyle phtalate
DiBP	Diisobutyle phtalate
DiPP	Di-isopentyle phtalate
DHP	Phtalate de dihexyle
DMP :	Diméthyle phtalate
DnPP ou DPP :	Di-n-pentyle phtalate ou Di-pentyle phtalate
DINP	Phtalate de diisononyle
DPrP :	Dipropyle phtalate
HAPs :	Hydrocarbures aromatiques polynucléaires
HJ	Hormone juvénile
m/m :	Masse par rapport à la masse
ng/g b.w	Nanogram per gram of body weight
OCDE/OECD :	Organisation de Coopération et de Développement Economiques (The Organisation for Economic Co-operation and Development)
PVC :	Polychlorure de vinyle

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Les abeilles

Les abeilles (Hyménoptères : Anthophila) sont un groupe monophylétique diversifié de pollinisateurs comprenant plus de 20 000 espèces décrites, réparties en sept familles (Melittidae, Apidae, Megachilidae, Andrenidae, Halictidae, Stenotritidae, Colletidae) et 25 sous-familles (Danforth et al., 2013). Elles se nourrissent principalement de nectar (source de sucre) et de pollen (source d'acides aminés, de protéines et de lipides) d'Angiospermes, aussi appelées plantes à fleurs (Campos et al., 2008 ; Vanderplanck et al., 2014). Elles présentent une grande variabilité en matière de morphologie et d'écologie (socialité, nidification, lectisme, *etc.* ; Michez et al., 2019).

1.1.1. Socialité et relations intra-spécifiques

Il existe chez les abeilles un gradient de sociabilité, allant des abeilles solitaires aux espèces eusociales (Figure 1). Les espèces solitaires représentent le type de socialité le plus courant, incluant 85 % des espèces d'abeilles (Michener, 2007). Dans ce type de socialité, les femelles confectionnent leur nid seules et n'ont pas de contact avec les autres individus de la même espèce, à l'exception des mâles lors de l'accouplement (Michez et al., 2019). Parmi les espèces eusociales se trouvent entre autres les bourdons et l'abeille mellifère (Michez et al., 2019). Ces espèces vivent en colonie, avec une structure organisée en caste (une reine, des ouvrières et des mâles), une division du travail et un chevauchement des générations (Lindauer, 1976). Dans ce type de socialité, la reine stérilise ses ouvrières en libérant des phéromones, de manière à ce qu'elle soit la seule à pondre des œufs, tandis que les ouvrières s'occupent de la progéniture (Brady et al., 2006). Contrairement à des espèces comme *Apis mellifera*, la colonie de certaines espèces eusociales, comme *Bombus terrestris*, présente une phase solitaire dans son cycle de vie : la reine, après avoir été fécondée en fin de saison de vol, hiberne seule. En début de saison suivante, elle construit son nid seule avant d'y fonder sa colonie (Michez et al., 2019).



Figure 1 : **A.** Agrégats de nids d'une espèce d'abeille solitaire, Cellophane inégale, *Colletes inaequalis* (© Spencer Hardy). **B.** Une abeille solitaire, l'Osmie cornue, *Osmia cornuta*, allant dans une galerie existante (© Marc Mangelschots). **C.** Nid d'abeille eusociale, le Bourdon terrestre, *Bombus terrestris* (© Wildbienen).

Chez les espèces eusociales, la communication entre individus est complexe et bien développée, notamment pour la coordination dans les tâches à réaliser, l'indication des sites de nourriture ou des sites de nidification (Michener, 1969 ; Conte & Hefetz, 2008). Cette communication est principalement sous le contrôle de signaux phéromonaux (Conte & Hefetz, 2008). Il existe différentes phéromones, telles que les phéromones sexuelles pour l'accouplement, les phéromones sociales essentielles à la cohésion des colonies, les phéromones d'alarme (notamment pour la défense), les phéromones de reconnaissance, *etc.* (Andreu, 2024). Les signaux de reconnaissance des semblables chez les insectes sont principalement olfactifs et sont contenus essentiellement dans les lipides cuticulaires (hydrocarbures cuticulaires ; Dani et al., 2005). Les composés cuticulaires peuvent aussi jouer un rôle de signalisation dans l'environnement du nid. Par exemple, pour marquer l'entrée de leur nid, les ouvrières de *B. terrestris* laissent des empreintes de pas qui sont des traces lipidiques cuticulaires (Rottler et al., 2013). La détection des molécules odorantes telles que ces phéromones se fait par des récepteurs olfactifs à l'intérieur des poils fins (sensilles) antennaires des abeilles (Burger et al., 2013 ; Gomez Ramirez et al., 2023). L'olfaction est donc un système très important chez les abeilles, surtout chez les espèces eusociales. Une perturbation de ce système pourrait engendrer un stress chez ces individus.

1.1.2. Relations plantes-pollinisateurs

Depuis leur émergence au Crétacé, les abeilles ont coévolué avec les Angiospermes, ce qui leur a permis de développer des adaptations morphologiques (brosse de récolte, poils) et comportementales spécialisées dans la collecte de pollen (Michener, 2000 ; Michez, et al., 2011). Seules les femelles présentent une brosse de récolte, qui, selon les taxons, se trouve sur différentes parties du corps (Michez, 2019). Cette collecte de pollen permet une pollinisation efficace et importante des plantes à fleurs, faisant des abeilles les insectes les plus importants dans le processus de pollinisation (Michener, 2000). La pollinisation est importante pour le rendement d'environ 85% des cultures (Gallai et al., 2009).

Toutes les abeilles ne visitent pas toutes les plantes à fleurs. En effet, il existe des espèces spécialistes, ne visitant qu'une seule espèce (monolectiques) ou une seule famille (oligolectiques) de plantes à fleurs et des espèces généralistes (polylectiques), visitant une grande variété de plantes à fleurs (Michez et al., 2008). Le choix floral de ces abeilles est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs. La longueur des pièces buccales (comme la langue) est un facteur morphologique limitant l'accès à certains types de plantes. En outre, un pollinisateur peut être attiré par le motif, la forme, ou encore la couleur des fleurs (Dötterl et al., 2011). L'abeille peut également être attirée par des molécules chimiques (composés organiques volatils ou COVs)

émises par la fleur, qui sont, pour la plupart, similaires à celles impliquées dans le système de communication chimique de l'abeille (Dötterl et al., 2006 ; Schiestl & Johnson, 2013). Ces molécules chimiques jouent un rôle crucial dans l'interaction plante-pollinisateur, en facilitant la localisation de la fleur et sa pollinisation, tandis que la plante offre en retour des ressources alimentaires au pollinisateur (Burger et al., 2013).

1.1.3. Déclin

L'Homme, en exploitant les écosystèmes, a altéré 75 à 95% de la biosphère terrestre (Kennedy et al., 2019 ; Ellis et coll., 2021). Les populations d'insectes ont diminué de 45% au cours de ces 40 dernières années (Wagner et coll., 2021). Les abeilles, fournissant des services écosystémiques importants tels que la pollinisation des plantes sauvages et de culture, sont également concernées par ces tendances (Potts et al., 2010 ; Ollerton et al., 2011). Leur déclin en matière d'abondance et de diversité représente un problème majeur, tant pour les écosystèmes naturels que pour les sociétés humaines (Matias et al., 2017 ; Ollerton, 2017 ; Porto et al., 2020).

Il existe plusieurs facteurs de déclin affectant les pollinisateurs, la plupart étant d'origine anthropique (Goulson et al., 2015) : citons notamment les changements climatiques (Dormann et al., 2008), les espèces exotiques (Stout & Morales, 2009), la propagation d'agents pathogènes (Cox-Foster et al., 2007), la concurrence entre les pollinisateurs sauvages et l'abeille mellifère (Torné-Noguera et al., 2016 ; Ropars et al., 2019), l'intensification de l'agriculture depuis les années 1990 dans diverses régions du monde (Lambin & Meyfroidt, 2011), la perte et la fragmentation des habitats dues aux changements d'affectation des terres (Ricketts et al., 2008), la pollution environnementale (Plutino et al., 2022), l'utilisation des produits agrochimiques (Alston et al., 2007) et l'urbanisation massive (Zattara & Aizen, 2021). Les facteurs cités ci-dessus peuvent également interagir ensemble (Tylianakis et al., 2008), accélérant ainsi le déclin des abeilles sauvages.

La perte et la fragmentation de l'habitat figurent parmi les facteurs les plus importants du déclin des pollinisateurs (Brown & Paxton, 2009). Environ 38% de la surface terrestre est utilisée à des fins agricoles, notamment pour une agriculture intensive (Foley et al., 2005). Avec l'expansion de l'agriculture, de plus en plus de produits agrochimiques sont utilisés dans les sols agricoles. Les pesticides tels que les insecticides, les fongicides et les herbicides ont des conséquences néfastes sur les populations d'abeilles via des effets létaux (Alston et al., 2007, Godfray et al., 2015) ou des effets sublétaux tels qu'une perturbation dans la recherche de nourriture, une modification du comportement pour récolter le nectar et le pollen ou encore des effets néfastes sur le développement et la reproduction des populations (Morandin et al., 2005).

En milieu urbain, l'Europe commence à implémenter des législations zéro-phyto de manière à ce que les villes n'utilisent plus de produits chimiques tels que des pesticides. Ces derniers sont donc moins présents que dans les milieux agricoles (Botías et al., 2015). Les zones urbaines concernées sont alors décrites comme refuges pour les pollinisateurs par certaines études (Thimmegowda et al., 2020). Mais ces initiatives sont encore loin d'être une généralité : toutes les villes n'ont pas encore adopté ces législations. Même si certains pollinisateurs semblent bien s'adapter dans les espaces verts des zones urbaines tels que les jardins communautaires et familiaux (Deguines et al., 2012 ; Baldock et al., 2019), le désherbage et l'utilisation de produits chimiques restent encore utilisés dans beaucoup de villes n'ayant pas adopté les législations zéro-phyto, ce qui impacte négativement les abeilles telles que les bourdons (Smith et al., 2006). De plus, la tonte fréquente des espaces verts diminue l'abondance des fleurs et des abeilles ainsi que leur richesse (Wastian et al., 2016 ; Lerman et al., 2018). L'expansion urbaine constitue également une menace pour la biodiversité (Seto et al., 2012). En outre, l'imperméabilisation des paysages urbains empêche les espèces d'abeilles de nidifier et diminue leur abondance (Geslin et al., 2016 ; Burdine & McCluney, 2019). En plus de ces contraintes, la pollution urbaine présente un risque important pour la santé des pollinisateurs. Les particules en suspension dans l'air peuvent s'accrocher sur leurs poils (Plutino et al., 2022) ou peuvent être ingérées en consommant des ressources alimentaires contaminées (Krunić et al., 1989). Parmi cette pollution se retrouvent les gaz d'échappement, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Rehwagen et al., 2005), ainsi qu'une nouvelle classe de polluants urbains émergents : les composés organiques volatils d'origine anthropique (COVa) dont font partie les phtalates (Bergé et al., 2013 ; Moreau-Guigon et al., 2016). Les effets de ces derniers sur les pollinisateurs, et en particulier sur les abeilles, sont peu connus malgré leur forte présence dans divers environnements, notamment en milieu urbain (Bergé et al., 2013). Ces phtalates pourraient représenter une nouvelle contrainte pour les populations d'abeilles vivant en zones urbaines.

1.2. Les phtalates

1.2.1. Définition, source et utilisation

Les phtalates (Figure 2), également appelés esters d'acide phtalique, sont des dérivés de l'acide phtalique (Bauer & Herrmann, 1997). Ils sont produits par la réaction de l'anhydride phtalique avec des alcools tels que le méthanol et l'éthanol afin d'obtenir de l'alcool tridécyle (C13), en présence d'un catalyseur (OCDE, 2018 ; Peijnenburg, 2008). Ce sont des éléments lipophiles (Mathieu-Denoncourt et al., 2016). Il existe différents phtalates. Ils se distinguent par leurs chaînes alkyles et ont des propriétés physico-chimiques qui varient (Staples et al., 1997, Tableau 1).

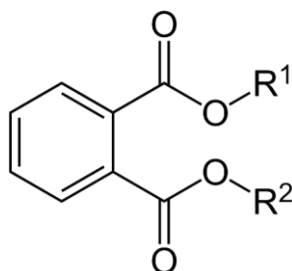


Figure 2 : Structure générale des phtalates. Ils sont composés d'un noyau benzénique, de deux groupements ester et de chaînes alkyles (R1 et R2) de longueurs variables (Source : Peijnenburg, 2008).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de six phtalates (Source : Saillenfait, A.M., 2005).

Composé	Di-n-butyl-phthalate	Butylbenzyl-phthalate	Di-n-octyl-phthalate	Phtalate de di-isononyle	Phtalate de di-isodécyle	Di-(2-ethylhexyl) phthalate
Abréviation	DnBP	BBP	DnOP	DINP	DIDP	DEHP
Masse molaire (g/mol)	278,34	312,36	390,56	418,62	446,68	390,56
Densité	1,04	1.12	0,98	0,97	0,97	0,99
Point de fusion^a (°C)	-35	- 40	- 25	- 48	- 48	- 47
Point d'ébullition^a (°C)	340	370	390	370	370	386
Tension de vapeur^a (Pa)	$3,6 \times 10^{-3}$	8×10^{-5} à 25 °C	$1,3 \times 10^{-5}$ à 25 °C	6×10^{-5} à 20 °C	$5,1 \times 10^{-5}$ à 25 °C	$1,3 \times 10^{-5}$ à 25°C
Solubilité dans l'eau	Faible (11,2 mg/L)	Faible (2,7 mg/L)	Pratiquement insoluble (0,5 µg/L)	Insoluble (<1 µg/l)	Insoluble (<1 µg/L)	Pratiquement insoluble (3 µg/L)

Les plastifiants sont des additifs incorporés aux matériaux plastiques afin d'augmenter leur plasticité, leur flexibilité (Billings et al., 2021). Ils représentent de 10 à 70% de la matière plastique (Hansen et al., 2013). Les phtalates sont souvent utilisés comme plastifiants des matériaux plastiques (Bauer & Herrmann, 1997). Ils ont été incorporés pour la première fois dans les années 1920 et leur production a augmenté dans les années 1930 lorsqu'ils ont commencé à être incorporés au polychlorure de vinyle (PVC) pour augmenter sa flexibilité (OCDE, 2018). Les esters d'acide phtalique sont présents dans beaucoup de produits tels que les matériaux d'emballages et de construction, les dispositifs médicaux, les jouets pour enfants, les outils, les adhésifs, et bien d'autres matériaux plastiques (Horn et al., 2004). Ils sont également utilisés comme solvants dans d'autres produits chimiques comme les peintures, les insecticides, les détergents, *etc.* ou comme activateurs de pénétration cutanée dans les produits de soins personnels et cosmétiques (Koniecki et al., 2011 ; Guo & Kannan, 2013). Afin de déterminer leur utilisation, beaucoup de

phtalates sont groupés selon leur poids moléculaire. Par exemple, le di-2-éthylhexyle phtalate (DEHP) est principalement utilisé dans les matériaux de construction comme plastifiant (Gaudin et al., 2011), tandis que le diméthyle (DMP) et le diéthyle (DEP) phtalates sont surtout retrouvés dans les cosmétiques ou comme solvants pour les revêtements et les muscs synthétiques (Sanchez-Prado et al., 2011).

Ces biens de consommation ont connu un développement important lors du siècle dernier, afin de fournir des produits moins chers, plus solides et durables (Meeker et al., 2009). Cela a provoqué une hausse de l'utilisation des phtalates. Leur production a ainsi atteint 5,5 millions de tonnes en 2018 (OCDE, 2018). La Chine représente le marché le plus important en la matière, consommant plus de la moitié de la production mondiale de phtalates (IHS Markit, 2021).

1.2.2. Pollution aux phtalates dans l'environnement

Les phtalates, n'étant pas liés de manière covalente à la matrice plastique, sont susceptibles de migrer de la matrice ou d'être lessivés et ainsi de se retrouver dans l'environnement (Fromme et al., 2002). Les phtalates ayant un poids moléculaire plus faible tels que le DEHP, le DEP, le phtalate de dibutyle (DBP), le phtalate de diisobutyle (DiBP) ou le phtalate de benzyle et de butyle (BBP), migrent généralement plus vite de la matrice (Hansen et al. 2013 ; Staples et al., 1997). Ils peuvent ensuite être transportés sur de longues distances par les eaux ou par l'air en s'attachant aux molécules plastiques présentes dans l'atmosphère (Feng et al., 2020). Ils sont semi-volatiles et peuvent également se lier aux particules lipidiques dans l'environnement, comme par exemple, la cuticule des insectes (Lenoir et al., 2014). Dans les milieux naturels, les phtalates peuvent être dégradés de différentes manières : par photodégradation dans l'atmosphère, par biodégradation dans les milieux aquatiques ou encore par dégradation dans les sédiments et les sols en conditions anaérobies (Staples et al., 1997 ; Gao & Wen, 2016).

Au niveau atmosphérique, Moreau-Guigon et collègues (2016) ont recensé des concentrations de 3,4 ng/m³ de DnBP et 28 ng/m³ de DEHP dans l'environnement extérieur de la ville de Paris. Ils ont également trouvé des concentrations de phtalates plus élevées dans l'air intérieur par rapport à l'air extérieur, sauf pour le DEHP (Moreau-Guigon et al., 2016). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les phtalates sont omniprésents dans les objets de consommation ou les objets plastiques présents dans les environnements intérieurs (Blanchard et al., 2014 ; Laborie et al., 2016). En effet, certains phtalates tels que le DiBP sont retrouvés principalement dans les produits de consommation et sont donc émis à l'intérieur des bâtiments, tandis que le DEHP est retrouvé aussi bien dans les matériaux intérieurs qu'extérieurs (Teil et al., 2006). Selon Rudel et Perovich (2009), les environnements intérieurs dans les zones fortement urbanisées semblent être une source majeure de polluants pour l'air ambiant extérieur. Cependant, les phtalates pouvant être

transportés sur de longues distances par les vents, ceux-ci ont également été recensés dans les milieux peu anthropisés. Des phtalates ont été trouvés dans l'Arctique (Xie et al., 2007) et sur des cuticules de fourmis de la forêt Amazonienne (0,5 ng/mg de poids sec à 2 ng/mg de poids sec ; Lenoir et al., 2016).

Les esters d'acides phtaliques peuvent être éliminés de l'atmosphère par dépôts secs et dépôts humides (Net et al., 2015). Selon Dargnat et collègues (2009), la principale source de contamination des eaux de pluie par les phtalates serait la volatilisation de ceux-ci depuis les matériaux de construction des bâtiments des zones urbaines. (Dargnat et al., 2009). Des concentrations de 0,423 µg/L de DEHP et de 0,592 µg/L pour le DnBP dans les eaux de pluie ont été recensées à Paris (Teil et al., 2006). Ces précipitations peuvent transférer les phtalates présents dans l'atmosphère vers les eaux douces, se dispersant ainsi dans les rivières, les lacs, les sédiments, *etc.* (Gao & Wen, 2016).

Les phtalates ont été détectés dans l'environnement aquatique dès 1978 (Giam et al., 1978) et le DEHP est celui qui est le plus souvent retrouvé dans cet environnement (Uren-Webster et al., 2010). Il a été détecté dans divers milieux, y compris dans les eaux douces ou marines et les zones industrielles (Giam et al., 1998). Ses concentrations peuvent atteindre 100 µg/L dans les eaux de surface et 200 mg/kg (poids humide) dans les sédiments (Petrović et al., 2001, Fromme et al., 2002). Ces derniers ont une grande capacité à adsorber les phtalates comme le DEHP, ce qui peut aussi affecter les organismes vivants dans ces milieux (Larsson & Thurén, 1987). De plus, le DEHP a une faible solubilité, ce qui lui permet d'avoir un potentiel d'accumulation dans les sols et les sédiments. Lorsqu'il est en suspension dans l'eau, sa demi-vie est d'environ deux à cinq semaines, tandis que dans les sédiments, sa demi-vie est estimée à plus de 100 ans en raison de son indisponibilité pour la biodégradation (Migliarini et al., 2011). Outre le DEHP, le DBP a également été retrouvé dans les eaux usées, les rivières et dans bien d'autres environnements (Liu et al., 2014 ; Chen et al., 2019). La valeur maximale de DBP a été détectée dans le delta du fleuve Yangtsé en Chine, atteignant 3,55 µg/L (Zhu et al., 2022).

Les dépôts atmosphériques sont des sources importantes de phtalates dans les sols, notamment via les précipitations (Net et al., 2015). En outre, il a été démontré que les phtalates pénètrent également dans les sols par l'application des pesticides, par l'irrigation (Michael et al., 1984) ou encore par l'épandage des boues d'épuration (Net et al., 2015). Le DnBP et le DEHP sont les plus présents dans les sols, les plus importants, avec des taux allant de 0,01 à 30,1 mg/kg de poids sec et de 0,02 à 264 mg/kg de poids sec respectivement. Des taux similaires dans les sols urbains et agricoles ont été observés (Bergé et al., 2013). Les sols européens (0,17 mg/kg de poids sec) semblent être moins contaminés en phtalates qu'en Chine (3,09 mg/kg de poids sec ; Bergé et al., 2013).

1.2.3. Impacts des phtalates sur les organismes

Les phtalates étant ubiquistes, les organismes y sont exposés continuellement (Mankidy et al., 2013). Ces polluants peuvent s'accumuler dans les organismes et se retrouver dans la chaîne alimentaire (Zhang et al., 2023). Des études ont démontré leurs effets néfastes sur les organismes et la santé humaine. Ils ont ainsi été identifiés comme perturbateurs endocriniens (Erkekoglu et al., 2016). En conséquence, l'utilisation de ces plastifiants a été restreinte et réglementée en Europe mais cela ne concerne pas les produits importés d'autres pays (Jobling et al., 1996 ; ECHA, 2018). L'utilisation de certains d'entre eux (DEHP, DBP et BBP) a été interdite dans la fabrication des jouets pour enfants (Directive 2005/84/CE, 2005). En ce qui concerne les emballages alimentaires à usage unique, l'utilisation du DEHP est également interdite (B-Lands Consulting, s. d. UE REACH). De plus, l'Union Européenne a banni l'utilisation du BBP, du n-pentyl-isopentyl phtalate, du di-n-pentyle phtalate (DnPP) et du di-isopentyle (DiPP) dans les cosmétiques (Directive 2005/80/CE, 2005).

La découverte croissante des dangers que représentent les phtalates pour l'être humain a accéléré le besoin de comprendre leurs effets sur le vivant. Étant des perturbateurs endocriniens, ces polluants peuvent, en raison de leur structure moléculaire, se fixer sur des récepteurs hormonaux et imiter ou bloquer l'action des hormones endogènes, mais aussi interférer avec les voies de synthèses et/ou de dégradations des hormones naturelles (Soto et al., 1995, Bradlee & Thomas, 2003). Cependant, les effets de ce type de molécule ne peuvent pas être prédits en fonction de la dose car ils présentent un profil de toxicité non monotone (Lagarde et al., 2015). Ces perturbateurs endocriniens affectent le système reproducteur des vertébrés en provoquant des effets oestrogéniques chez les femelles, notamment chez le rat et l'humain ou encore chez le poisson zèbre, *Danio rerio* (Jobling et al., 1995 ; Carnevali et al., 2010). Ils peuvent également provoquer des effets anti-oestrogéniques chez la femelle medaka japonaise, *Orizias latipes* (Kim et al., 2002), et des effets anti-androgéniques chez les rats et les lapins (Higuchi et al., 2003). Sans oublier leurs effets obésogènes, neurotoxiques et immunotoxiques, notamment chez les humains (Grün & Blumberg, 2009 ; Casas et al., 2013).

Beaucoup d'études ont été réalisées sur les organismes aquatiques puisque les phtalates sont rejetés dans l'environnement de manière quasi continue et peuvent donc être trouvés en grande quantité dans les écosystèmes aquatiques (Oehlmann et al., 2008). Quelques années auparavant, ces études se sont concentrées sur la toxicité des phtalates principalement sur des organismes aquatiques avec l'hypothèse que si les phtalates à hautes concentrations n'avaient pas d'effets sur ces organismes, les faibles doses de ces phtalates n'affecteraient pas non plus ceux-ci (Staples et al., 1997). Actuellement, de plus en plus d'études se tournent vers le profil d'activité non monotone des perturbateurs endocriniens, notamment des phtalates (Lagarde et al., 2015). Il a

été découvert que ces derniers induisent, tout comme chez les vertébrés, différents effets néfastes sur ces organismes aquatiques. Par exemple, il a été observé chez les crevettes, *Macrbrachium rosenbergii*, que le DEP, le DHP (phtalate de dihexyle), le DPrP (dipropyle phtalate) et le DPP peuvent endommager leurs hémocytes et diminuer leur immunité cellulaire, les réactions immunitaires variant en raison des effets toxiques différents des phtalates (Sung et al., 2003 ; Chen & Sung, 2005). Les phtalates affectent également le poids corporel et la reproduction de certaines espèces. Une exposition des juvéniles de *Daphnia magna* à des concentrations de 1 et 10 μ M de DnBP ou de DEHP augmente la teneur en lipides dans ces organismes (Seyoum & Pradhan, 2019). De plus, cette même étude a montré que la reproduction de cette espèce était augmentée de 1,5 fois par rapport au témoin (Seyoum & Pradhan, 2019).

Une étude menée sur des larves du quatrième stade de *Chironomus riparius* a révélé que le BBP semble être plus toxique que le DEHP pour ces larves (Planelló et al., 2011). En effet, le BBP a provoqué la mort de 60 % des larves exposées durant 24 heures à une concentration de 100 mg/L de BBP alors que le DEHP n'a causé aucune mortalité parmi celles-ci (taux de survie de 100 %). Planelló et collègues (2011) ont mis en évidence une diminution légère mais significative de la transcription de l'ARN ribosomique par de hautes concentrations au BBP (\pm 15 % d'inhibition pour 1mg/L). Cette perturbation peut entraîner des lésions cellulaires qui pourraient expliquer le taux de mortalité élevé occasionné par ce phtalate. Le DEHP n'a quant à lui pas affecté la transcription de l'ARN ribosomique. Cela pourrait expliquer que le taux de survie au DEHP n'a pas été impacté. (Planelló et al., 2011). Dans cette même étude, Planelló et collègues (2011) ont également démontré la capacité potentielle des phtalates à modifier la réponse au stress et la voie de signalisation de l'ecdysone des insectes. Une exposition au DEHP ou au BBP de ces larves du quatrième stade semble réguler à la hausse le gène *hsp70* (gène exprimé en réponse à un stress) de manière dépendante de la concentration. De plus, ces deux phtalates affectent l'expression du gène *EcR*, l'un des gènes permettant les changements de mue et de métamorphose, le BBP (à 0,1mg/L et plus) induisant sa surexpression et le DEHP (100 mg/L) provoquant une diminution de son activité (Planelló et al., 2011).

Très peu d'études se sont concentrées sur l'impact des phtalates sur les invertébrés terrestres, notamment chez les arthropodes, puisque leur cuticule remplit un rôle de protection face à l'environnement extérieur (Balabanidou et al., 2018). Cependant, les phtalates étant lipophiles, il a été démontré par Cuvillier-Hot et collègues (2014) que cette cuticule constitue une voie d'entrée pour les phtalates atmosphériques. En effet, certains d'entre eux ont été retrouvés dans les cuticules de fourmis noires des jardins, *Lasius niger*, à Tours (France ; Lenoir et al., 2012). Des taux de phtalates (DEHP, DBP, DiBP et BBP cumulés) d'environ 25 ng/mg de poids sec ont été retrouvés sur les cuticules de fourmis *Solenopsis saevissima* et d'autres espèces vivant en ville (ex. Kourou et

Cayenne, Guyane) contre 2 ng/mg de poids sec chez les fourmis vivant en forêt tropicale amazonienne (Lenoir et al., 2016). De plus, les phtalates ont également été retrouvés dans leurs corps gras, ce qui suggérerait qu'ils traversent la barrière épidermique (Lenoir et al., 2012). La cuticule lipidique serait donc un piège pour les phtalates (Cuvillier-Hot & Lenoir, 2020) malgré leurs effets répulsifs chez les fourmis de feu, *Solenopsis invicta* (Chen, 2005).

Les quelques études menées sur les insectes terrestres ont montré que ces polluants peuvent avoir des effets sur ces organismes. Par exemple, il a été démontré chez la noctuelle *Spodoptera littoralis* qu'une contamination au DEHP, l'un des phtalates retrouvés sur la cuticule des espèces de fourmis, perturbe la voie des ecdystéroïdes et peut donc avoir des effets sur les différentes voies biologiques telles que le système immunitaire, le développement, les voies métaboliques du sucre et des lipides ou sur la reproduction (Mankidy et al., 2013 ; Avilès et al., 2020). En ce qui concerne ce dernier paramètre, il a été démontré chez les fourmis *L. niger*, que le DEHP impacte négativement la fertilité de la reine et active leur système immunitaire (Cuvillier-Hot et al., 2014). Une autre étude réalisée sur *S. littoralis* démontre qu'une exposition des stades larvaires au DEHP influence également le taux de reproduction. En effet, lorsqu'un mâle exposé oralement à hautes doses de DEHP (1,1 µg, 19,7 µg et 4,3 mg par gramme d'aliment) durant son développement s'accouple avec une femelle non exposée, les chances d'éclosions et la viabilité sont réduites, ce qui suggérerait que les mâles exposés produisent moins de spermatozoïdes. (Avilès et al., 2020). D'autres effets du DEHP ont été mis en évidence sur cette même espèce : des doses élevées de ce phtalate non trouvées dans l'environnement (4,3 mg et/ou 39,5 mg par gramme d'aliment) altèrent le cycle de vie, allongent certains stades larvaires mais aussi nymphals et augmentent le taux de mortalité de ceux-ci (Avilès et al., 2019). Le DEHP diminue également l'expression des gènes des récepteurs nucléaires *EcR* et *USP* (Avilès et al., 2019), des gènes *E75*, *E78*, tous impliqués dans la voie des ecdystéroïdes antennaires, et provoque aussi une diminution du gène de la calmoduline (Avilès et al., 2020), impliqué dans l'olfaction (Xu et al., 2017).

Diverses études ont démontré les effets biologiques du DEHP sur la drosophile, *Drosophila melanogaster*, tels que la peroxydation lipidique (ZHAO et al., 2003), l'expression de l'insuline (Cao et al., 2016) et la neurotoxicité (Ran et al., 2012). Une autre étude a démontré qu'une exposition au DEHP (0,005, 0,01, 0,02 M) au troisième stade larvaire de ces drosophiles altère l'activité des enzymes anti-oxydants neutralisant les ROS, ce qui induit un stress oxydatif et entraîne une augmentation du taux de ROS. Cette augmentation endommage ainsi l'ADN des tissus, notamment ceux des intestins larvaires, provoquant in fine l'apoptose de ces cellules. Cela conduit également à la cytotoxicité et à la génotoxicité chez les larves du troisième stade (Gaur et al., 2023). L'effet d'un autre phtalate, le DINP a également été étudié chez ces organismes et semble avoir des effets létaux. En effet, une exposition supérieure à 0,2% de DINP (v/v) induit une diminution de la durée

de vie qui dépend du sexe, et une augmentation du taux de mortalité chez cette espèce (Zhang et al., 2020). Chen et collègues (2019) ont exposé la drosophile au DEHP et ont constaté que la durée de vie des mâles diminuait de manière dose – dépendante lorsque la concentration était inférieure à 0,5 %, tandis que les mouches femelles présentaient une réponse non monotone (Chen et al., 2019). Ce phtalate peut également provoquer une série d'effets sublétaux liés à la reproduction, à la longévité, au comportement, à la capacité anti-famine et aux changements biochimiques (Zhang et al., 2020).

1.3. Impacts des phtalates sur les abeilles sauvages

L'impact des phtalates sur les abeilles n'est pas encore bien connu. Cependant, les effets néfastes observés chez d'autres invertébrés, notamment chez les insectes terrestres, suggèrent que ces esters d'acide phtalique pourraient également affecter les abeilles. Ces dernières peuvent être exposées à ces polluants trouvés dans tous les environnements, aussi bien en ville, qu'en milieu peu anthropisé (Lenoir et al., 2016). Elles peuvent être facilement en contact avec ces polluants par l'intermédiaire de leurs poils ou leur cuticule (Gómez-Ramos et al., 2016). Cette dernière, composée d'une procuticule (en chitines et protéines) et d'une épicuticule (en protéines, hydrocarbures et lipides), est favorable à l'adsorption de substances lipophiles comme les phtalates (Balabanidou et al., 2018). Ces derniers ont été retrouvés sur la cuticule des abeilles mellifères, avec un taux représentant 0,73% de leurs composés cuticulaires, montrant ainsi une contamination importante par ces polluants (Lenoir et al., 2012). Les phtalates peuvent également pénétrer à l'intérieur du corps des insectes en traversant leur cuticule, comme témoigne la présence de phtalates dans le corps gras des fourmis (Lenoir et al., 2012). De plus, les matrices de nidification des abeilles, constituées de matériaux variés tels que le bois, les fibres végétales, la cire, la terre, *etc.* en fonction des espèces (Michez et al., 2019), peuvent également être des vecteurs de contaminations aux phtalates. En effet, l'ubiquité de ces derniers leur permet de se déposer sur ces matériaux, de s'y accumuler et d'être, *in fine*, incorporés dans les nids (Shen et al., 2022). Sur les zones côtières du sud de la Chine, divers phtalates ont été retrouvés dans les feuilles de plantes à des taux variables. Dans cette étude, le DnBP et le DEHP sont les deux phtalates retrouvés avec la concentration moyenne la plus élevée dans les échantillons analysés, avec respectivement 2,282 mg/kg et 4,144 mg/kg (Xing et al., 2022). Des taux de phtalates ont également été retrouvés dans des racines et des feuilles de plantes cultivées telles que des laitues, des carottes ou encore des fraises. Par exemple, le DnBP et le DEHP ont été retrouvés respectivement à des taux d'environ 2 500 et 1 500 µg/kg de poids sec de racines de carottes et à des taux d'environ 500 et 1 250 µg/kg de poids sec de feuilles de carottes (Dodgen et al., 2013). Les phtalates, étant des composés organiques volatils lipophiles, pourraient également se retrouver dans le pollen des plantes, ce dernier étant composé en partie de lipides. Ce pollen

collecté par les abeilles et potentiellement contaminé pourrait être ramené au sein du nid afin de nourrir les membres de la colonie ou les larves d'abeilles solitaires et ainsi contaminer le couvain (Gómez-Ramos et al., 2016). Une étude a également détecté la présence de phtalates tels que le DEP, le BBP ou encore le DEHP dans la cire des ruches des abeilles mellifères, indiquant une contamination des nids par ces polluants (Gómez-Ramos et al., 2016).

Pour saisir l'impact que les phtalates pourraient avoir sur ces pollinisateurs, il est important de savoir que le système hormonal des abeilles est complexe et joue un rôle crucial dans la régulation du développement, de la reproduction, de la pollinisation et du comportement social. L'hormone juvénile (HJ), sécrétée par les corps allates (*corpora allata*), et les ecdystéroïdes (principalement l'ecdysone et le 20-hydroxyecdysone (20E)), sécrétés par les glandes prothoraciques, régulent des processus essentiels tels que le développement (mues, métamorphoses) et la reproduction (Nijhout, 1994 ; Gruntenko & Rauschenbach, 2008 ; Jindra et al., 2013). Les phtalates, en tant que perturbateurs endocriniens, pourraient déréguler ces voies hormonales, perturbant ainsi le développement et la reproduction des abeilles. Ces dérégulations ont été observées sur la noctuelle *Spodoptera littoralis* (Avilès et al., 2019 ; Avilès et al., 2020). Chez cette même espèce, il a été démontré que les phtalates diminuent l'expression des gènes impliqués dans la voie des ecdystéroïdes antennaires, provoquant ainsi une diminution de l'olfaction (Avilès et al., 2019). Ces phtalates pourraient également avoir des effets négatifs sur l'olfaction des abeilles. Ce qui ne serait pas sans conséquences. En effet, chez de nombreux insectes tels que ces pollinisateurs, ce sens est important pour le comportement social et sexuel, notamment via la perception des phéromones et hormones sexuelles, les relations intra-spécifiques entre individus (Canivenc-Lavier et al., 2013) ou encore pour l'interaction plantes-pollinisateurs.

Les phtalates pourraient jouer un rôle dans le déclin des populations d'abeilles en perturbant leur développement, leur comportement et leur reproduction. De plus, un modèle prédictif (KNN/IRFMN v.1.0.0.) suggère une toxicité importante des phtalates sur les abeilles (Arulanandam et al., 2022). Il est donc crucial d'évaluer l'impact de ces phtalates sur ces pollinisateurs, en commençant par investiguer leur létalité à des doses environnementales.

Chapitre 2 : Objectifs du mémoire et hypothèses de départ

Ce mémoire s'intègre dans le projet ASPI (Abeilles sauvages en ville : effets des polluants urbains sur la santé des insectes et sur les interactions plantes – pollinisateurs), un projet étudiant les impacts des polluants urbains sur la santé des insectes et les interactions plantes – pollinisateurs.

L'objectif principal de ce mémoire de fin d'étude est d'investiguer la toxicité de deux phtalates, le DnBP et le DEHP, à des doses environnementales sur la santé de *Bombus terrestris*, en les exposant par application topique. L'investigation de cet objectif principal se divise trois parties, à savoir :

- Évaluer la toxicité du DnBP et du DEHP à doses différentes environnementales individuelles et en mélange.
- Investiguer la toxicité de ces deux phtalates à différentes doses en conditions d'élevage isolées et en conditions d'élevage sociales (microcolonies).
- Investiguer les effets de ces deux phtalates sur le développement des microcolonies exposées.

Selon les résultats d'une expérience préliminaire du projet ASPI (données en cours de publication), une mortalité de *B. terrestris* placée dans des conditions d'élevage individuelles et exposée au DnBP seul est attendue. De plus, nous émettons l'hypothèse que les effets du DnBP et du DEHP combinés sur *B. terrestris* induiraient également une mortalité importante.

Nous émettons aussi l'hypothèse que le taux de mortalité sera plus élevé chez les bourdons exposés et placés dans des cages individuelles par rapport à ceux exposés et placés dans des microcolonies. L'effet colonial pourrait jouer un rôle tampon sur la toxicité des phtalates, comme cela a été observé avec d'autres molécules telles que les néonicotinoïdes (Crall et al., 2019).

Enfin, les phtalates étant des perturbateurs endocriniens, il est possible que ceux-ci affectent également le système reproducteur et le cycle de reproduction de *B. terrestris* (Avilès et al., 2019 ; Avilès et al., 2020).

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1. Modèle biologique étudié : *Bombus terrestris*

Les bourdons sont des insectes de l'ordre des Hyménoptères, plus précisément de la famille des Apidae. Ils font partie du genre *Bombus*, un des genres d'abeilles eusociales (Michener, 2000), comptant environ 270 espèces. Ce genre se retrouve dans la quasi-totalité de l'hémisphère nord jusqu'en Amérique du Sud mais est pratiquement absent en Afrique et en Océanie (Michener, 2000). Il existe trois phases de développement de la colonie. La première est l'initiation de la colonie durant laquelle la reine fécondée sort d'hibernation au printemps afin de fonder seule une colonie (Goulson, 2010). La reine pond des œufs diploïdes donnant les premières ouvrières (phase eusociale ; Duchateau & Velthuis, 1988). Au fil des pontes, la réserve de spermatozoïdes de la reine s'épuise et elle commence à pondre des œufs haploïdes, donnant des mâles (Michener, 1974 ; Doorn & Heringa, 1986). C'est la phase de commutation. La dernière phase, dite de compétition, commence lorsque la colonie arrive en fin de vie, c'est-à-dire quand les ouvrières commencent à pondre des œufs, donnant également des mâles (Duchateau & Velthuis, 1988). Ce phénomène de ponte a lieu car la reine perd sa dominance au sein de la colonie (Van Honk et al., 1980 ; Röseler et al., 1981). Le reste des œufs pondus par la reine donnent les jeunes reines de la génération suivante avec un système reproducteur pleinement développé. Les nouvelles reines sortent du nid, s'accouplent et entrent à leur tour en hibernation jusqu'au printemps suivant. Elles fonderont les colonies de la génération suivante, tandis que les ouvrières et les mâles mourront (Goulson, 2010 ; Figure 3).

L'espèce *B. terrestris* a été choisie pour réaliser les expériences car c'est une espèce à large distribution dans le monde. De plus, les pollinisateurs sont de bons bioindicateurs dans les milieux agricoles, industriels et urbains (Bromenshenk et al., 1985) et sont donc utilisés pour surveiller les polluants. *B. terrestris*, espèce très polylectique, butine un très grand nombre d'espèces de plantes et joue un rôle crucial en tant que pollinisateur dans les communautés de plantes cultivées et sauvages, contribuant ainsi de manière importante aux services écosystémiques (Velthuis & Doorn, 2006 ; Kleijn & Raemakers, 2008). En outre, c'est une espèce facile à élever, elle présente une grande faculté d'adaptation, la rendant facilement procurable et utilisable en laboratoire (Kleijn & Raemakers, 2008). Son élevage a commencé en Belgique et aux Pays-Bas en 1988 (Velthuis, 2002). Aujourd'hui, *B. terrestris* est largement domestiqué et de nombreuses colonies sont exportées à travers divers pays (Velthuis & Doorn, 2006). Cette espèce est aussi exploitée à des fins commerciales afin de favoriser la pollinisation des cultures en serre (Siralı et al., 2012).

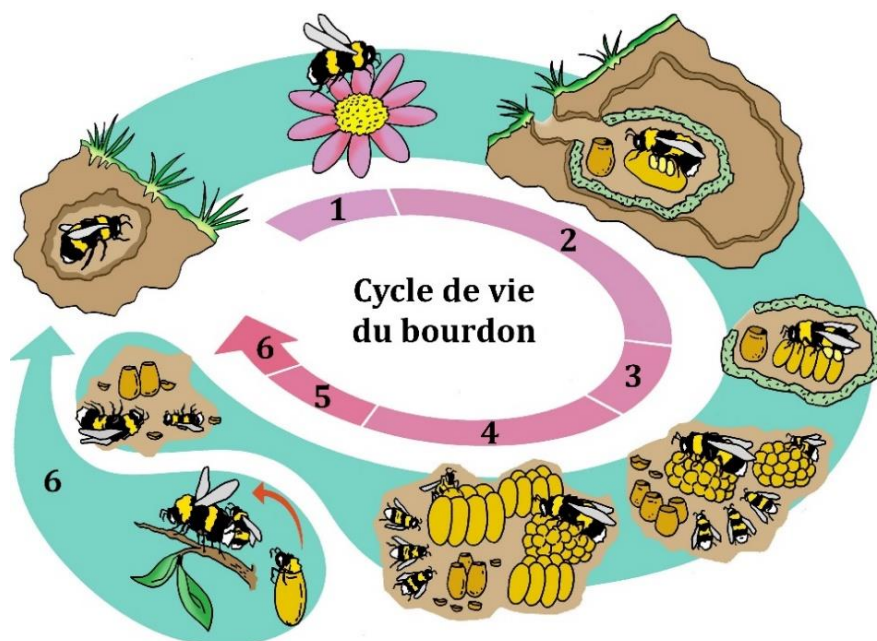


Figure 3 : Schéma du cycle de vie général du bourdon. 1. Au début du printemps, la jeune reine fécondée sort d'hibernation et commence à chercher des ressources alimentaires. 2. Elle trouve un endroit pour commencer son nid, creuser des cavités souterraines. Elle y construit des pots à nectar et des cellules où elle pond ses premiers œufs. 3. Les premières ouvrières émergent et effectuent des tâches de la colonie pendant que la reine continue à pondre ses œufs. 4. À la fin de l'été, la colonie produit ainsi des mâles et les œufs de la reines restants donne de jeunes reines. 5. Les mâles et les jeunes reines émergent et quittent la colonie pour se reproduire. 6. L'hiver, les jeunes reines fécondées entrent en hibernation avant de fonder une colonie la saison suivante, tandis que les mâles et les ouvrières meurent. (Source : modifiée du site Koppert US).

3.2. Molécules étudiées et concentrations

Les molécules sélectionnées pour les expositions par application topique sont le DnBP et le DEHP. Elles ont été choisies car ce sont deux des phtalates qui semblent être les plus présents dans l'environnement (Xie et al., 2006). De plus, ces deux phtalates ont été retrouvés sur les cuticules de bourdons de la ville de Lille pendant des campagnes du projet ASPI en 2021 (données en cours de publication). Enfin, elles semblent avoir des effets sur les voies hormonales des insectes. (Avilès et al., 2019 ; Avilès et al., 2020 ; Zhang et al., 2020).

Les ouvrières de *B. terrestris* maintenues individuellement ont été exposées à l'un des trois contrôles : eau minérale plate Spa Reine, méthanol , 0,07 %, acétone pur ; ou l'une des 10 doses de phtalates suivantes : DnBP à concentration 6 ng/g de poids corporel (ng/g b.w), DnBP à concentration 60 ng/g b.w, DnBP à concentration 600 ng/g b.w, DnBP à concentration 6 000 ng/g b.w, DEHP à concentration 12 ng/g b.w, DEHP à concentration 120 ng/g b.w, DEHP à concentration 1 200 ng/g b.w, DEHP à concentration 12 000 ng/g b.w, mélange (cocktail) de DnBP 60 & de DEHP 120 ng/g b.w ou à un mélange de DnBP 600 & de DEHP 120 ng/g b.w. Seules sept des 13 conditions citées précédemment pour l'expérience en conditions individuelles ont été utilisées pour l'expérience en conditions sociales (microcolonies). Dans cette dernière expérience,

les ouvrières ont été exposées à l'un des deux contrôles : eau minérale plate Spa Reine, méthanol 0,07% ; ou à l'une des cinq doses de phtalates suivantes : le DnBP 60 ng/g b.w, le DnBP 600 ng/g b.w, le DEHP 12 ng/g b.w, le DEHP 120 ng/g b.w ou au mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Tableau 2). L'exposition au contrôle méthanol 0,07 % ainsi qu'au contrôle eau minérale ont été utilisés pour évaluer la toxicité du solvant (méthanol 0,07 %).

Les doses de DnBP (Sigma-Aldrich™ ; CAS : 84-74-2 ; C_{stock} : 1,043 x 10⁶ ng/μL) allant de 6 à 600 ng/g b.w et de DEHP (Sigma-Aldrich™ ; CAS : 117-81-7 ; C_{stock} : 9,85 x 10⁵ ng/μL) allant de 12 à 1200 ng/g b.w ont été diluées dans un premier solvant, le méthanol (CAS : 67-56-1), afin de permettre la solubilisation des phtalates dans l'eau minérale plate Spa Reine par la suite. Cela permet également de diminuer le taux de méthanol en solution à 0,07 %. Concernant les doses plus élevées de DnBP (6 000 ng/g b.w) et de DEHP (12 000 ng/g b.w), la dilution a été réalisée dans de l'acétone pur (CAS : 67-64-1) après avoir testé sa toxicité sur les ouvrières (Annexe 1, point 7.1.2.). Les phtalates étant lipophiles, les dilutions sont plus difficiles dans le méthanol et dans l'eau minérale. La solubilité diminue avec une augmentation du poids moléculaire et devient difficile lorsque leur limite solubilité est dépassée (Bradlee & Thomas, 2003). La solution contrôle méthanol 0,07% a été obtenue en mélangeant 7 μl de méthanol pur avec 9993 μl d'eau minérale Spa Reine.

Tableau 2 : Molécules utilisées pour les expériences d'exposition par application topique. Ce tableau reprend les différents phtalates ainsi que leurs doses utilisées, le type d'expérience (conditions d'élevage individuelle ou sociale) utilisant les différentes doses environnementales et enfin le contrôle utilisé pour chaque dose de phtalate. Le traitement méthanol 0,07 % est une dilution du méthanol pur dans de l'eau minérale Spa Reine. Les doses de DnBP 6 ng/g b.w à 600 ng/g b.w, de DEHP 12 ng/g b.w à 1 200 ng/g b.w ainsi que les mélanges de DnBP & de DEHP ont été diluées dans du méthanol et de l'eau minérale Spa Reine. Les doses de DnBP 6 000 ng/g b.w et de DEHP 12 000 ng/g b.w ont été diluées dans de l'acétone pur et de l'eau minérale Spa Reine.

Phtalates	Dose (ng/g b.w)	Expérience(s)	Contrôles
DnBP	6	Individuelle	Eau minérale ; méthanol 0,07 %
	60	Individuelle ; sociale	
	600	Individuelle ; sociale	
	6 000	Individuelle	Acétone
DEHP	12	Individuelle ; sociale	Eau minérale ; méthanol 0,07 %
	120	Individuelle ; sociale	
	1 200	Individuelle	
	12 000	Individuelle	Acétone
Mélange de DnBP & de DEHP	60 & 120	Individuelle ; sociale	Eau minérale ; méthanol 0,07 %
	600 & 120	Individuelle	

3.3. Dispositifs expérimentaux

Le matériel utilisé pour les expériences était préférentiellement en métal ou en verre. L'utilisation du plastique a été évitée lors de nos expérimentations en raison de la présence potentielle de phtalates dans ceux-ci. Avant toute manipulation, le matériel a été calciné quand cela était possible, ou a été décontaminé sous hotte, avec de l'hexane (CAS : 110-54-3) et de l'acétone pur (CAS : 67-64-1). L'hexane permet de capturer les phtalates qui seraient potentiellement présents sur le matériel (les phtalates étant semi-volatiles et présents dans l'atmosphère). L'acétone permet d'enlever l'hexane et les phtalates du matériel.

3.3.1. Exposition de contact individuelle des ouvrières

3.3.1.1. Installation et maintien

Toutes les manipulations ont été réalisées sous lumière rouge car les bourdons ne détectent pas cette longueur d'onde et ne voient donc pas cette couleur. Sous ces conditions, le bourdon est désorienté et ne peut donc voler, ou difficilement. Cela limite surtout leur stress (OCDE, 2018).

Les colonies mères de *B. terrestris* utilisées pour cette expérience ont été fournies par la firme Biobest® et contenaient entre 80 et 120 ouvrières ainsi qu'une reine. Elles ont été maintenues à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, à humidité constante ($61\% \pm 5\%$) et ont été nourries une fois par semaine avec du pollen de saule, en plus d'avoir eu accès à une ressource de sirop Biobest® *ad libitum*. Chaque colonie a été utilisée pendant un mois maximum après sa réception.

Durant cette expérience, 14 sessions ont été réalisées, une session correspondant à six jours de manipulations. Pour chaque session, 72 ouvrières de deux colonies mères différentes ont été placées dans des cages individuelles artisanales en métal de dimensions similaires aux Nicot Cages® et préalablement décontaminées (Figure 4), sur trois plateaux recouverts d'aluminium et de papier essuie-tout. Un plateau regroupe 24 ouvrières (de deux colonies mères différentes) exposées à une même condition (traitement phtalate ou contrôle ; Figure 5). Placer 72 ouvrières dans les cages individuelles permet d'avoir 12 individus supplémentaires afin d'en exposer suffisamment (60 individus exposés à l'un des traitements ou contrôles, soit 20 individus par condition) en cas de mortalité due aux conditions de maintien de l'élevage. Les individus provenant de la même colonie ont été placés côte à côte afin d'éviter un stress. En effet, les bourdons sont des espèces eusociales pour qui la possibilité de contact permet de réduire le stress dû aux conditions d'élevage (OCDE, 2017). Des pipettes pasteurs bouilées en verre ont été remplies de sirop sucrose – eau 50 % m/m (50 % sucre cristallisé – 50 % eau minérale) tous les jours, permettant aux individus de s'alimenter *ad libitum*. L'eau utilisée pour le sirop provient des bouteilles en verre Spa Reine (eau minérale plate) afin de limiter la pollution de l'eau du robinet

(taux de phtalates allant de 0,133 – 3,804 µg/L ; Net et al., 2015) et éviter la contamination de phtalates pouvant provenir des emballages de bouteilles en plastique (Luo et al., 2018).

Après avoir installé les ouvrières, une période d'acclimatation de minimum huit heures a été nécessaire afin de les habituer aux nouvelles conditions de maintien. Elles ont été laissées dans le noir durant cette période.

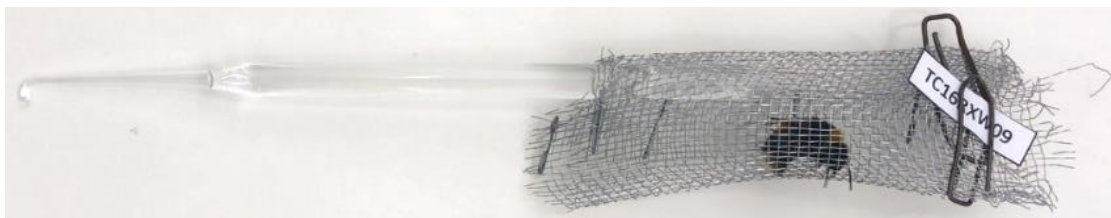


Figure 4 : Ouvrière de *B. terrestris* dans une cage individuelle en métal. La pipette en verre contient du sirop, permettant à l'ouvrière de s'en substantier. Chaque ouvrière contient un code unique (photographie : A. Pinchon).



Figure 5 : Trois plateaux contenant 72 ouvrières de *B. terrestris* dans des cages individuelles, séparées par colonie (une colonne par colonie) et par condition (un plateau par condition). Seules 60 ouvrières sur les 72 sont exposées à une des conditions (20 par condition ; photographie : A. Pinchon).

3.3.1.2. Exposition topicale aigüe

Il a été convenu d'exposer les bourdons de manière topicale et non de manière orale en raison d'une expérience réalisée, démontrant que les fourmis *L. niger* sont capables de détecter des phtalates tels que le DEHP présents dans leur nourriture, et évitent ainsi de s'en sustenter (Cuvillier et al., 2014). Une hypothèse a été émise sur le fait que *B. terrestris* est également capable de détecter des phtalates présents dans leur nourriture, ce qui aurait engendré des biais dans l'expérience. L'exposition par application topique permet d'éviter ces biais. En effet, ce type d'exposition permet d'administrer une dose exacte de phtalate à chaque bourdon de manière égale. De plus, cela permet de mimer le mode d'exposition du bourdon aux phtalates atmosphériques. L'atmosphère semble être l'une des principales sources de contamination selon les résultats obtenus par le projet ASPI (données en cours de publication ; Lenoir et al., 2012).

Le protocole d'exposition topicale aiguë a été inspiré de la norme OCDE 246, 2017, pour l'évaluation de la toxicité des composés chimiques via une exposition aiguë de *B. terrestris*. Chacune des 14 sessions a été réalisée comme suit : après la période d'acclimatation, 20 ouvrières ont été exposées à une dose de traitement phtalate, 20 autres ont été exposées au contrôle eau minérale et 20 dernières l'ont été à un contrôle méthanol (Tableau 3). Seule la session 12 correspondant aux doses environnementales de phtalates les plus hautes testées diffère légèrement : 20 ouvrières ont été exposées au DnBP 6 000 ng/g b.w, 20 autres ont été exposées au DEHP 12 000 ng/g b.w et 20 dernières l'ont été au contrôle acétone pur (Tableau 3).

Tableau 3 : Nombre d'ouvrières exposées à une des molécules lors des 14 sessions. Une session correspond à six jours de manipulations. Pour chaque session, 60 ouvrières provenant de deux colonies mères ont été exposées à leur molécule respective par application topique aiguë.

Sessions	Molécules utilisées pour la session	Nombre d'ouvrières exposées
Session 1 (DnBP)	DnBP 6 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 2	DnBP 60 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 3	DnBP 60 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 4 ¹	DnBP 60 ng/g b.w	19
	Eau minérale	19
	Méthanol 0,07 %	20
Session 5	DnBP 600 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 6	DnBP 600 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 7	DEHP 12 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 8 ²	DEHP 120 ng/g b.w	12
	Eau minérale	20

¹ Suite au décès de plusieurs ouvrières avant leur exposition, seules 19 ouvrières ont été exposées au DnBP 60 ng/g b.w et 19 autres ont été exposées au contrôle eau minérale.

² Suite à une erreur de manipulation de la session 8, seules 12 ouvrières ont été exposées au DEHP 120 ng/g b.w. Une session supplémentaire (session 9) a donc été nécessaire afin d'exposer le reste des ouvrières au traitement correspondant.

	Méthanol 0,07 %	20
Session 9	DEHP 120 ng/g b.w	8
	Eau minérale	8
	Méthanol 0,07 %	8
Session 10	DEHP 1200 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 11	DEHP 1200 ng/g b.w	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 12	DnBP 6 000 ng/g b.w	20
	DEHP 12 000 ng/g b.w	20
	Acétone pur	20
Session 13	DnBP 60 & DEHP 120	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	20
Session 14	DnBP 600 & DEHP 120	20
	Eau minérale	20
	Méthanol 0,07 %	21

Durant la période d'exposition, après retrait de la pipette pasteur, les ouvrières ont été endormies sur glace deux par deux dans leurs cages, dans des bocaux en verre décontaminés, durant environ 10 minutes. Cela leur permet de s'endormir progressivement et d'éviter qu'elles subissent un choc thermique. Ensuite, 2 microlitres de traitement ont été déposés sur la partie glabre du thorax de l'ouvrière à l'aide d'un micro-capillaire et à travers la cage (Figure 6). Une fois réveillés à température ambiante, les bourdons exposés ont été replacés en salle d'élevage. Cela permet d'éviter le stress que pourrait engendrer les variations de température entre la sortie de la glace ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) et la remise en salle d'élevage ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Leur pipette remplie de sirop leur a été remise à disposition.

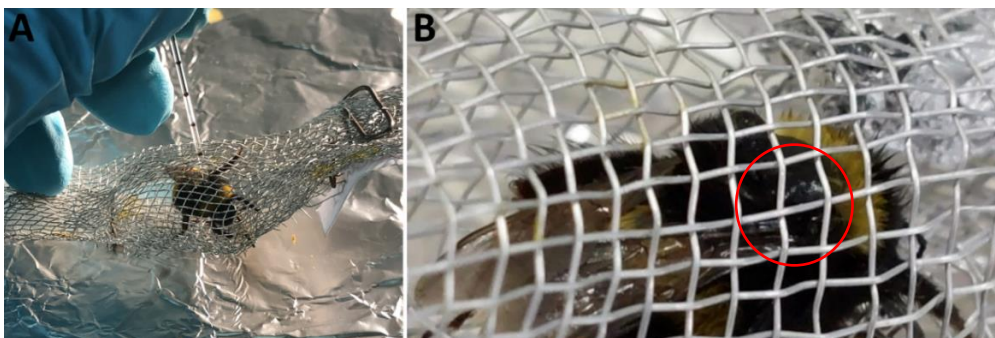


Figure 6 : Exposition topique aigüe d'une ouvrière de *B. terrestris* en conditions individuelles. **A.** Application d'une goutte de traitement de 2 microlitres sur le thorax d'une ouvrière à travers la cage, une fois celle-ci endormie (photographie A. Pinchon). **B.** Zoom sur une ouvrière venant de recevoir 2 microlitres de traitement sur son thorax (photographie : D. Evrard).

3.3.1.3. Paramètre mesuré : analyse de la mortalité

Le taux de mortalité des ouvrières a été évalué à 16 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures après l'exposition topicale aiguë. À chaque observation, les ouvrières mortes ont été pesées. En fin de période d'observation, les ouvrières restantes ont été pesées et congelées afin de les sacrifier.

Des données supplémentaires des expositions par application topique réalisées par Justine Dewaele (Projet ASPI, Lille) ont été utilisées pour les analyses de la mortalité, en plus des données générées pour ce mémoire. Il est important de préciser quelques différences par rapport à l'expérience réalisée dans ce mémoire : la période d'acclimatation des ouvrières était de huit heures ; les ouvrières ont été endormies dans un congélateur à -20°C durant 10 minutes et la vérification du taux de mortalité a été réalisée à 16 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures après l'exposition des ouvrières. Le matériel et méthodes de ces données supplémentaires est disponible en annexe (Annexe 2).

3.3.2. Exposition de contact en microcolonies

3.3.2.1. Installation et maintien des microcolonies

Toutes les manipulations ont été réalisées sous lumière rouge pour les mêmes raisons citées au point 3.3.1.1.

Cinq colonies mères provenant de la firme Biobest® ont été utilisées pour réaliser l'expérience d'exposition topique et chronique des microcolonies qui a duré 35 jours. Elles ont été maintenues en salle d'élevage à une température d'environ $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ et à humidité constante ($61\% \pm 5\%$). Une microcolonie par colonie mère et par traitement (huit traitements réalisés, qui seront développés par après) a été préparée. Une microcolonie est constituée d'ouvrières de *B. terrestris* provenant d'une seule colonie mère. 40 microcolonies ont donc été installées en une journée.

Les microcolonies ont été placées dans des boîtes transparentes en plastique dur de 16 x 16 x 10 cm (Figure 7 A). Le nourrissage a été permis grâce à des pots à sirop de type Corning® Gosselin™ où le sirop est amené aux ouvrières par capillarité (Figure 7 B). Du pollen d'aubépine sous forme de candies leur a également été fourni à l'intérieur de la boîte en plastique. Les microcolonies ont été étiquetées selon le nom de l'expérience, la colonie mère, le bloc de lancement et le traitement. Ensuite, elles ont été placées sur les étagères de la salle d'élevage à une température d'environ $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ et à humidité constante ($61\% \pm 5\%$). Elles ont été rangées par ordre de colonie mère et regroupées par traitement (Figure 7 C). La période d'acclimatation des microcolonies a été de deux jours.



Figure 7 : Conditions d'élevage des microcolonies. A. Cage en plastique contenant une microcolonie de 10 ouvrières de *B. terrestris*. Une boîte en plastique est placée sous cette cage pour y accueillir le récipient à sirop. Cette cage est aussi équipée d'un socle grillagé pour faciliter le nourrissage et l'évacuation des excréments de la microcolonie. B. Pots à sirop en plastique avec un trou dans le capuchon afin de permettre le passage d'un capillaire en coton. Ce dernier permet au sirop de monter par capillarité et à la colonie de s'en sustenter. C. Microcolonies placées par traitement sur des étagères dans une salle d'élevage. La salle est maintenue à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ et à un taux d'humidité de $61\% \pm 5\%$ (photographies : A. Pinchon).

3.3.2.2. Exposition par application topique et chronique

L'expérience (réalisée de manière topicale et non par voie orale pour les raisons évoquées au point 3.3.1.2.) a nécessité la mise en place de huit traitements (Tableau 4). Parmi ces huit traitements, trois conditions de contrôles ont été établies afin de tenir compte des effets potentiels du dispositif expérimental mis en place pour le développement des microcolonies : (I) contrôle « rien » : microcolonies non traitées aux phtalates et au froid afin de tenir compte de ces deux facteurs sur le développement et la mortalité des microcolonies, (II) contrôle « eau minérale » : microcolonies exposées au froid et traitées à l'eau minérale afin de tenir compte de l'impact du froid sur le développement et la mortalité des microcolonies, (III) contrôle « solvant » : microcolonies exposées au froid et traitées au méthanol 0,07 % afin de tenir compte de l'impact de ce solvant sur les microcolonies. Cinq traitements phtalates ont été mis en place en plus de ces contrôles : (I) DnBP 60 ng/g b.w, (II) DnBP 600 ng/g b.w, (III) DEHP 12 ng/g b.w, (IV) DEHP 120 ng/g b.w, et (V) un mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w.

Tableau 4 : Tableau des huit traitements ainsi que leurs abréviation, composition et dose. Chaque traitement est associé à cinq microcolonies de 10 ouvrières (nombre de microcolonies par traitement = 5).

Molécule/composition	Type de condition	Dose (ng/g b.w)	Abréviation
Rien	Contrôle	/	O000
Eau minérale	Contrôle	/	C000
Solvant (méthanol 0,07%)	Contrôle	/	S000
DEHP	Traitement phtalate	12	D012
DEHP	Traitement phtalate	120	D120
DnBP	Traitement phtalate	60	P060
DnBP	Traitement phtalate	600	P600
Mixte DnBP & DEHP	Traitement phtalate	60 & 120	X180 ou Mix180

Les microcolonies ont été exposées à un de ces traitements une fois par semaine, sauf pour le traitement contrôle « rien » où les individus ne sont ni exposés au froid, ni aux molécules. La première exposition a eu lieu après la période d'acclimatation. Les bourdons ont été endormis sur glace deux par deux dans des bocaux en verre décontaminés durant 10 minutes. 2 microlitres de traitement ont été appliqués et étalés sur la partie glabre du thorax de chacun (Figure 8). Une fois réveillés à température ambiante, ils ont été replacés en salle d'élevage dans leur microcolonie respective afin d'éviter le stress que pourraient engendrer les variations de température.

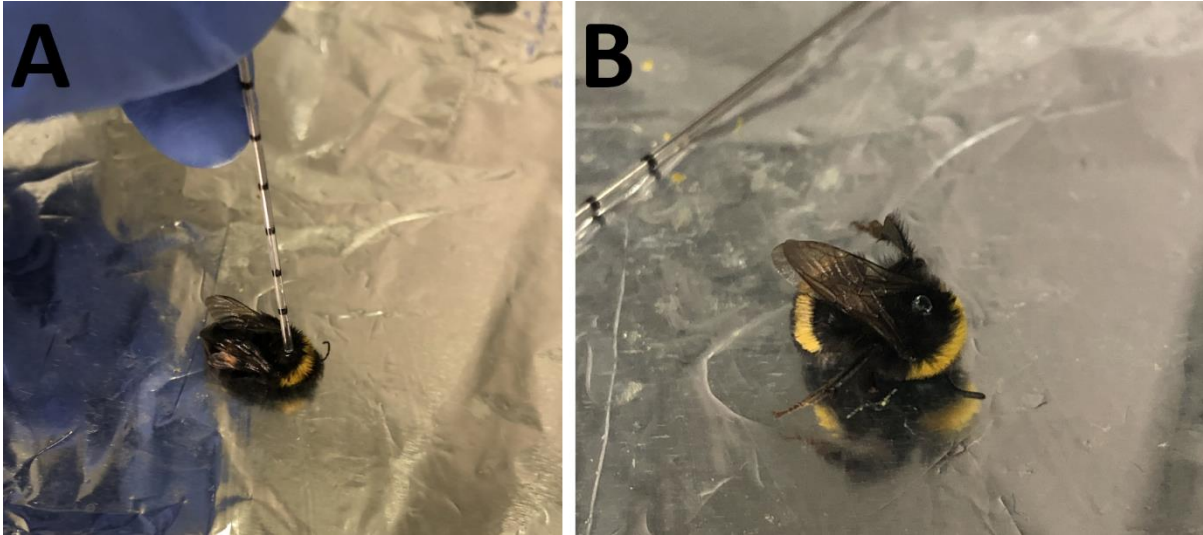


Figure 8 : Exposition topicale chronique d'une ouvrière endormie à un traitement. A. Application de 2 microlitres de traitement sur l'ouvrière endormie sur glace durant 10 minutes et posée sur le ventre. **B.** Ouvrière endormie venant de recevoir 2 microlitres sur son thorax. Par la suite, cette goutte a été étalée sur le thorax de cette ouvrière (photographie : A. Pinchon).

3.3.2.3. Consommation de sirop et de pollen d'aubépine

Les candis ont été obtenus en mélangeant du pollen d'aubépine avec un ratio de 0,25 à 0,30 ml de sirop par gramme de pollen. Les candis ont été préparés, pesés (erreur standard = $\pm 0,001$ g) et remplacés tous les deux jours afin de déterminer la consommation de pollen des microcolonies. Le premier candi préparé a été laissé au centre de la colonie afin de permettre aux ouvrières de débiter la construction de leur nid par-dessus. Les microcolonies ont été nourries avec les candis *ad libitum*. Au début de l'expérience, les premiers candis d'une masse de $1,1 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ ont été placés dans chaque microcolonie. Au fur et à mesure que les microcolonies consommaient leur candi, la masse de ce dernier a été augmentée. Quelques jours avant la fin de l'expérience, la masse du candi était de $4,5 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$. Un candi contrôle a également été préparé afin de tenir compte du taux d'évaporation et a été placé dans une microcolonie sans ouvrières. Les candis ont été distribués aux microcolonies à l'aide d'un plateau en carton et d'une pince en métal (Figure 9).



Figure 9 : Candis de pollen d'aubépine. Ceux-ci sont obtenus en mélangeant du pollen d'aubépine et du sirop (50/50) avec un ratio de 0,25 à 0,30 ml par gramme de pollen. Les candis sont d'abord pesés puis placés sur le plateau en carton, triés par traitement. Les lettres allant de A à E correspondent aux lettres des microcolonies. Les codes donnés aux traitements sont : O000 = contrôle rien ; S000 = contrôle solvant ; C000 = contrôle eau ; D012 = DEHP 12 ng/g b.w ; D120 = DEHP 120 ng/g b.w ; P060 = DnBP 60 ng/g b.w ; P600 = DnBP 600 ng/g b.w ; X180 = mélange de DnBP 60 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w. Un candi de pollen « EVAP » est également préparé afin de tenir compte du taux d'évaporation (photographie : A. Pinchon).

De plus, du sirop sucrose – eau minérale Spa Reine 50% m/m a été mis à disposition des ouvrières dans chaque microcolonie. Le sirop est pesé et rempli tous les deux jours afin de déterminer la quantité consommée par les microcolonies. Un pot contrôle de sirop a également été déposé dans la microcolonie sans ouvrières afin de tenir compte du taux d'évaporation.

3.3.2.4. Paramètres mesurés

Différents paramètres sont mesurés en conditions sociales, à savoir la mortalité des ouvrières au sein des microcolonies, la consommation de sirop et pollen des ouvrières en microcolonies ainsi que le développement des stades larvaires (nombre d'individus et masses). Ce dernier paramètre a pu être mesuré, car, à cette échelle, la reine n'était pas présente dans la microcolonie et ne pouvait donc pas transmettre ses phéromones aux ouvrières. Cela a donc permis à celles-ci d'entamer la ponte d'individus mâles et à la microcolonie de se développer (Röseler, 1970).

À l'instar des conditions individuelles, les ouvrières ont été pesées, flashées à l'azote liquide et conservées à -80°C. Le taux de corps gras, l'expression de gènes notamment impliqués dans l'olfaction, le développement, l'immunité, le métabolisme et dans la voie des ecdystéroïdes ainsi que des paramètres d'activité antibactérienne de l'hémolymphe sont aussi des paramètres qui seront ultérieurement mesurés par Justine Dewaele dans le cadre de sa thèse.

3.3.2.4.1. Mortalité

Le taux de mortalité des ouvrières a été évalué tous les deux jours à partir de la première exposition de contact des ouvrières des microcolonies. À partir du 30^{ème} jour d'expérience, la mortalité a été évaluée tous les jours. Les ouvrières mortes ont été pesées. En outre, les larves éjectées ont été dénombrées. L'éjection de ces larves en cours de développement est un comportement adapté par les ouvrières lorsque celles-ci sont soumises à un stress (Pomeroy & Plowright, 1979). Ce comportement permet d'évaluer le stress des microcolonies selon le traitement auquel elles sont soumises. Il est donc possible, en dénombrant les larves éjectées et les ouvrières mortes, d'évaluer ces réponses au stress.

3.3.2.4.2. Production des microcolonies

Durant l'expérience, le nombre de mâles émergés par traitement a été relevés. Ces mâles ont également été pesés. À la fin de l'expérience, les microcolonies ont été disséquées afin d'observer leurs différents stades de développement, ces derniers étant : les œufs, les larves non isolées, les larves isolées pré défécation, les larves isolées post défécation, les pupes, les mâles non émergés (Figure 10). Les larves non isolées ont été pesées en groupe sur une balance analytique et dénombrées. Les œufs et les larves éjectées ont été dénombrés et non pesés. Le reste des stades du cycle de développement du bourdon ont été pesés individuellement et dénombrés par stade.

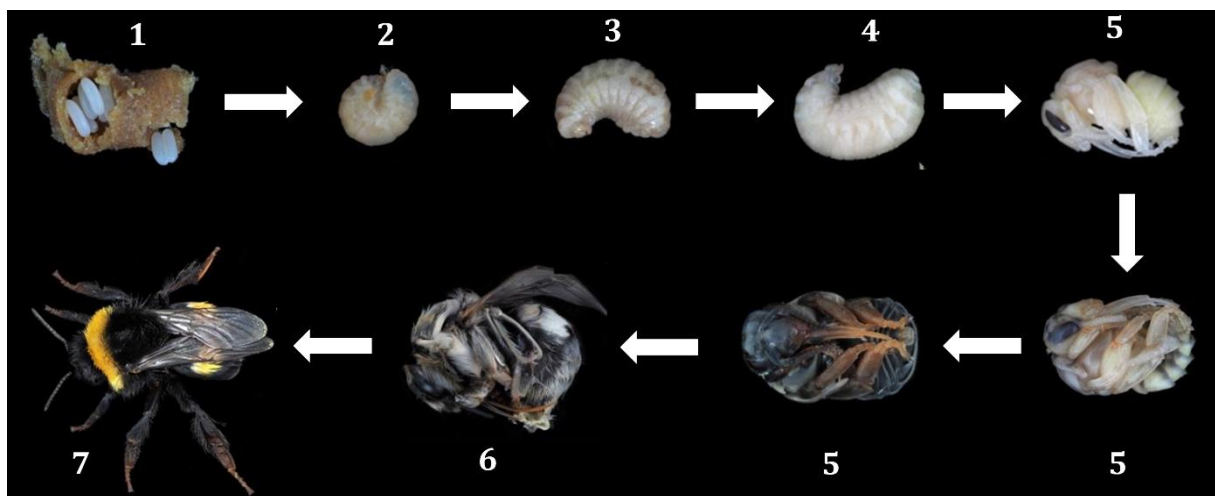


Figure 10 : Stades de développement de *B. terrestris*. Les différents stades de développement sont les suivants : 1. Les œufs ; 2. Les larves non isolées ; 3. Les larves isolées pré défécation ; 4. Les larves isolées post défécation ; 5. Les pupes ; 6. Les mâles non émergés ; 7. Les bourdons terrestres adultes. Notez que les ouvrières peuvent mettre des larves sur le côté de la colonie, les larves éjectées (non représentées ici), qui ne passeront pas par ces différents stades (Crédits des photographies : Paolo Rosa, Projet PoshBee (2022)).

3.3.2.4.3. Consommation des ressources

Afin de déterminer la quantité de pollen et de sirop consommée par les ouvrières des 40 microcolonies sur les 35 jours, la masse du pot contenant le sirop et ainsi que celle des candis de pollen a été relevé tous les deux jours. Une microcolonie sans ouvrières a été utilisée comme

témoin pour estimer la perte de masse du sirop et du pollen due à l'évaporation, avec des relevés également effectués tous les deux jours.

3.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 4.4.0 (2024-04-24 ucrt). Pour ces analyses, un seuil de significativité a été fixé à une valeur de $p < 0,05$. Lorsque les résultats sont significatifs, un test de comparaison deux à deux est réalisé (fonction « emmeans », package « emmeans » ; Lenth, 2018). Tous les graphes ont été générés avec ggplot2 (Wickham, 2016) exceptés ceux faisant référence à la probabilité de survie des ouvrières (courbes de Kaplan-Meier) réalisés avec la fonction « ggsurvplot », package « survminer » (Kassambara et al. 2021).

3.5.1. Analyse de la mortalité à l'échelle individuelle

Des données générées par Justine Dewaele ont été utilisées en plus des données générées pour ce mémoire. Les analyses sur le taux de mortalité s'arrêtent à 72 heures après l'exposition par application topique. Les effets des traitements sur la mortalité des ouvrières ont été évalués à l'aide de modèles linéaires généralisés mixtes (GLMM) à distribution binomiale avec une fonction de lien logit (fonction « glmmTMB », package « glmmTMB » ; Brooks et al., 2017). Le traitement et l'expérimentateur ont d'abord été sélectionnés comme facteur fixe et la colonie mère comme facteur aléatoire. Si aucune différence significative n'a été détectée entre expérimentateurs, seul le traitement a été sélectionné comme facteur fixe et la colonie mère comme facteur aléatoire. À problème de séparation complète (lorsqu'une des niveaux d'un effet fixe explique pleinement la variable de réponse binomiale ; effet Hauck-Donner), une inférence Bayésienne en utilisant un a priori par défaut (c'est-à-dire une moyenne nulle normale) sur l'effet fixe a été utilisée (fonction « bglmer », package « blme » ; Chung, et al., 2013). Des courbes de Kaplan-Meier ont été réalisées, ainsi que des modèles de régression de Cox (fonction « coxph », package « survival » ; Therneau, 2024) avec le traitement comme facteur fixe, afin d'analyser la significativité du taux de mortalité. Il est à noter que lorsque le contrôle eau et le contrôle solvant n'étaient pas significativement différents, ils ont été regroupés en un seul groupe « Contrôle » (OCDE, 2017). De plus, les individus morts englués ou coincés dans les cages ont été supprimés des analyses (environ 10 individus concernés).

3.5.2. À l'échelle coloniale

3.5.2.1. Mortalité

Afin d'analyser les effets des traitements sur le taux de mortalité des microcolonies exposées, une courbe de Kaplan-Meier ainsi qu'un modèle de régression de Cox ont été réalisés (fonction « coxph », package « survival » ; Therneau, 2024). Le traitement a été utilisé comme facteur fixe.

3.5.2.2. Production des microcolonies et consommation des ressources

Le nombre d'individus total produits par les microcolonies ainsi que le nombre d'individus de chaque stade de développement ont été analysés avec une distribution de Poisson et une fonction de lien log (fonction « glmmTMB », package « glmmTMB » ; Brooks et al., 2017). Les problèmes de surdispersion (« testDispersion ») et d'inflation nulle (« testZeroZinflation ») ont été vérifiés à l'aide du package DHARMA (Hartig, 2021). Dans le cas d'une surdispersion ou d'une inflation nulle, un modèle binomial négatif avec la famille « nbinom2 » a été utilisé (fonction « glmmTMB », package « glmmTMB » ; Brooks et al., 2017), en tenant compte du problème d'inflation nulle lorsque celui-ci était présent. Pour ces deux modèles, le traitement a été défini comme facteur fixe et la microcolonie comme facteur aléatoire.

Un modèle linéaire mixte (LMM) à distribution gaussienne (fonction « lmer » du package « lme4 » ; Bates et al., 2015) est effectué pour la masse totale du couvain, la masse des différents stades de développement des microcolonies ainsi que pour la collecte de sirop et de pollen, uniquement si les données sont symétriques (fonction « skewness », package « e1071 » ; Meyer et al., 2023) et si les résidus suivent une distribution normale (fonction « shapiro.test » du package « stats » ; R Core Team 2018). Si ces deux conditions ne sont pas respectées, un GLMM à distribution Gamma et une fonction de lien log est utilisé (fonction « glmmTMB », package « glmmTMB » ; Brooks et al., 2017). Le traitement a été défini comme facteur fixe et la microcolonie comme facteur aléatoire. Les mâles émergés n'ont pas fini d'être pesés et enregistrés. Nous avons donc réalisé les analyses sur les individus déjà pesés (322 sur 584 mâles).

Chapitre 4 : Résultats

Pour les expériences d'expositions topiques aiguës individuelles (données de Justine Dewaele et d'Audrey Pinchon), 1144 ouvrières ont été exposées à un des traitements phtalates ou contrôle. En conditions d'élevage individuelles, 687 ouvrières sont exposées au contrôle, 189 à une des doses de DEHP, 228 à une des doses de DnBP, 20 au mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w ainsi que 20 au mélange de DnBP 600 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w.

Pour l'expérience d'exposition topicale chronique, 40 microcolonies composées de 10 ouvrières ont été placées dans des conditions d'élevage optimales durant 35 jours. 400 ouvrières ont donc été exposées à leur traitement phtalate ou contrôle respectif. Au total, 323 ouvrières de *B. terrestris* vivantes ont été récupérées à la fin de l'expérience. Au total, 584 mâles ont émergé durant cette expérience.

4.1. Mortalité à l'échelle individuelle

Les contrôles solvants (méthanol 0,07 % et acétone pur) ainsi que les contrôles eau minérale des différentes sessions de DnBP ont été réunis en un seul groupe « Contrôle » car ils n'étaient pas significativement différents entre eux (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 12,326$, $df = 6$, p -value = 0,05507). Il en va de même pour les contrôles solvants et les contrôles eau minérale des différentes sessions de DEHP (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 7,4966$, $df = 6$, p -value = 0,2773). Pour certaines sessions.

Sur les 1144 ouvrières de *B. terrestris* exposées, 1053 ont survécu à l'exposition d'un des traitements et 91 sont mortes. Les ouvrières placées dans des cages individuelles et traitées au DnBP 60 ng/g de bourdon sont celles ayant eu le plus de mortalité (environ 20% de mortalité). 4% des ouvrières exposées au DEHP 12 ng/g b.w, au DnBP 6 ng/g b.w, sont mortes, représentant les traitements ayant eu le taux de mortalité le plus bas (Tableau 5).

Tableau 5 : Nombre d'ouvrières vivantes ou mortes exposées par traitement. Le pourcentage de mortalité a été calculé comme suit : (ouvrières mortes / (ouvrières mortes + ouvrières vivantes)) *100. Les traitements DEHP et DnBP sont exprimés en ng/g b.w.

Traitements	Contrôle	DEHP 12	DEHP 120	DEHP 1200	DEHP 12000	DnBP 6	DnBP 60	DnBP 600	DnBP 6000	DnBP 60 & DEHP 120	DnBP 600 & DEHP 120
Vivants	649	47	47	61	17	48	71	58	19	19	17
Morts	38	2	3	9	3	2	18	11	1	1	3
Pourcentage de mortalité (%)	6	4	6	13	15	4	20	16	5	5	15

4.1.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle

L'exposition aiguë aux différentes doses de DnBP a un effet significatif sur la mortalité des ouvrières (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 20,277$, $df = 4$, p -value = 0,0004402 ; Figure 11). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, seul le DnBP 60 ng/g b.w a un effet significatif sur la mortalité des ouvrières de *B. terrestris* par rapport au contrôle (post-hoc, p -value = 0,0001). Une augmentation non significative de la mortalité pour le traitement DnBP 60 ng/g b.w par rapport au DnBP 600 ng/g b.w est observée (post-hoc, p -value = 0,0538). La courbe de Kaplan-Meier montre une diminution du taux de survie des ouvrières au DnBP 600 ng/g b.w dès les 16 premières heures après exposition et diminue jusqu'à 72 heures après exposition (Figure 12). Le DnBP 6 ng/g b.w semble être le traitement ayant un taux de mortalité d'ouvrières le plus faible (± 96 %). La mortalité a augmenté 72 heures après l'exposition pour le DnBP 60 ng/g b.w et le DnBP 600 ng/g b.w mais pas pour le DnBP 6 ng/g b.w. La régression de Cox montre un effet significatif des traitements sur la mortalité des ouvrières (Régression de Cox, p -value = 0,000331). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg suivant la régression de Cox, le DnBP 60 ng/g b.w a diminué significativement la survie des ouvrières par rapport au contrôle (post-hoc, p -value = 0,0004). Le DnBP 600 ng/g b.w a également diminué la survie des ouvrières par rapport au contrôle (post-hoc, p -value = 0,0380).

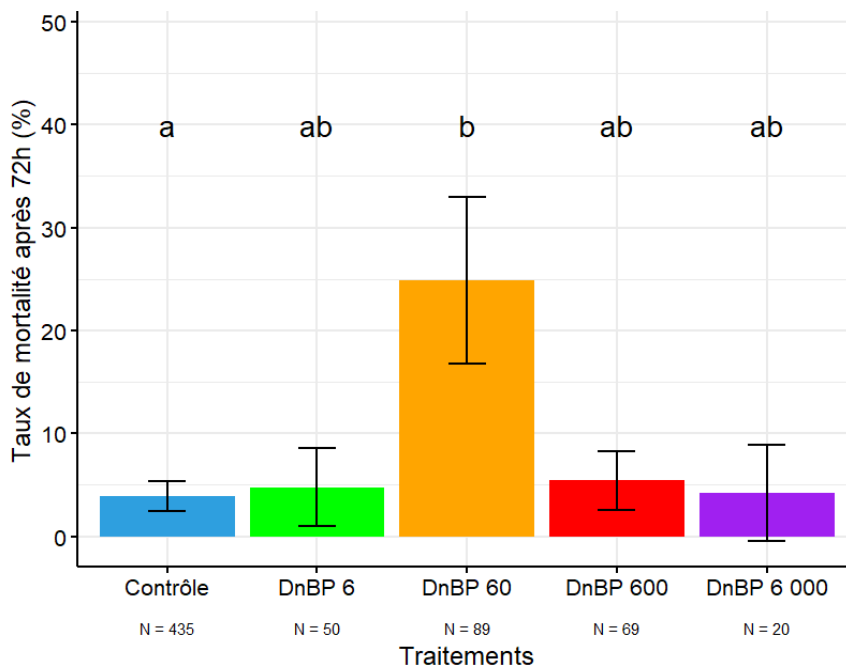


Figure 11 : Taux de mortalité (%) des ouvrières en fonction des traitements DnBP à doses environnementales (ng/g b.w) et du contrôle 72 heures après exposition. Nombre totale d'ouvrières exposées à une des conditions = 663. Les lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard ; GLMM, famille binomiale).

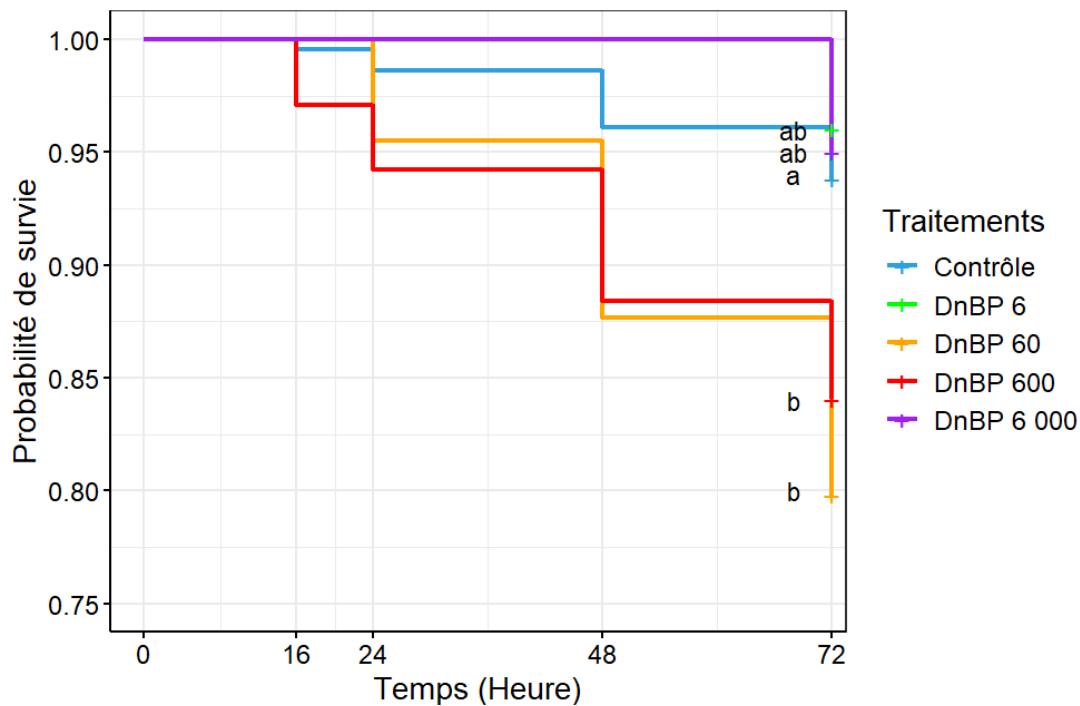


Figure 12 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières de *B. terrestris* exposées aux traitements DnBP à doses environnementales (ng/g b.w) et au contrôle. Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (nombre total d'ouvrières exposées = 663). Chaque étape correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment de l'exposition de toutes les ouvrières et le taux de mortalité est observé jusqu'à 72 heures. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Notons que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.75 - 1.00).

4.1.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle

L'exposition topicale aiguë aux différents traitements de DEHP n'a pas eu d'effets significatifs sur la mortalité des ouvrières de *B. terrestris*, quelle que soit la dose de DEHP utilisée (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 3,9738$, $df = 4$, p -value = 0,4096 ; Figure 13). La courbe de Kaplan-Meier indique que le DEHP 12 ng/g bw est le traitement ayant le taux de survie des ouvrières le plus élevé (environ 96 % ; Figure 14). L'exposition des ouvrières au DEHP 12 000 ng/g b.w a réduit la survie des ouvrières de 15 %, avec un premier taux de survie ayant chuté 48 heures et 72 heures après l'exposition. Cependant, la régression de Cox montre un effet non significatif des traitements sur la mortalité des ouvrières (Régression de Cox, p -value = 0.2253).

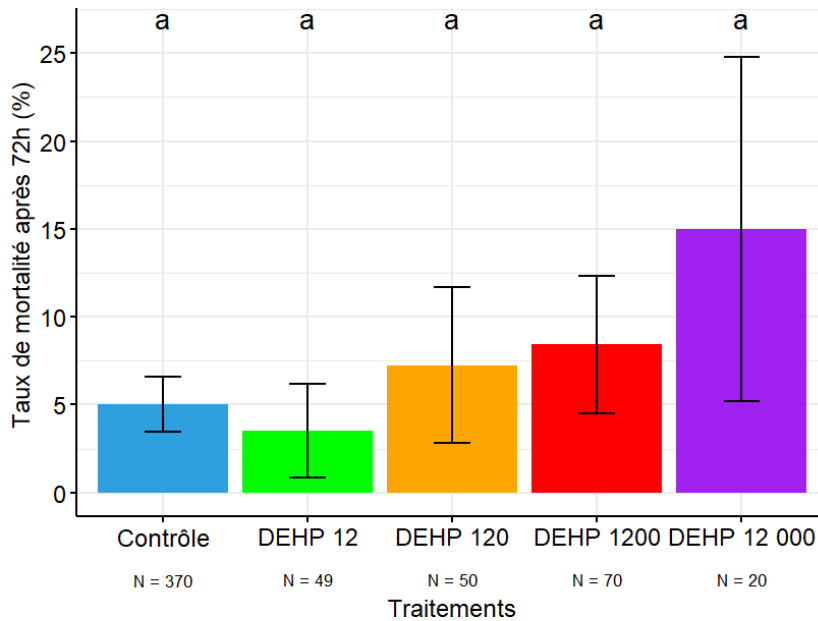


Figure 13 : Taux de mortalité (%) des ouvrières en fonction des traitements DEHP à doses environnementales (ng/g b.w) et du contrôle 72 heures après exposition. Nombre total d'ouvrières exposées à un des traitements = 559. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard ; GLMM, famille binomiale). Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements ou contrôle (p -value > 0,05).

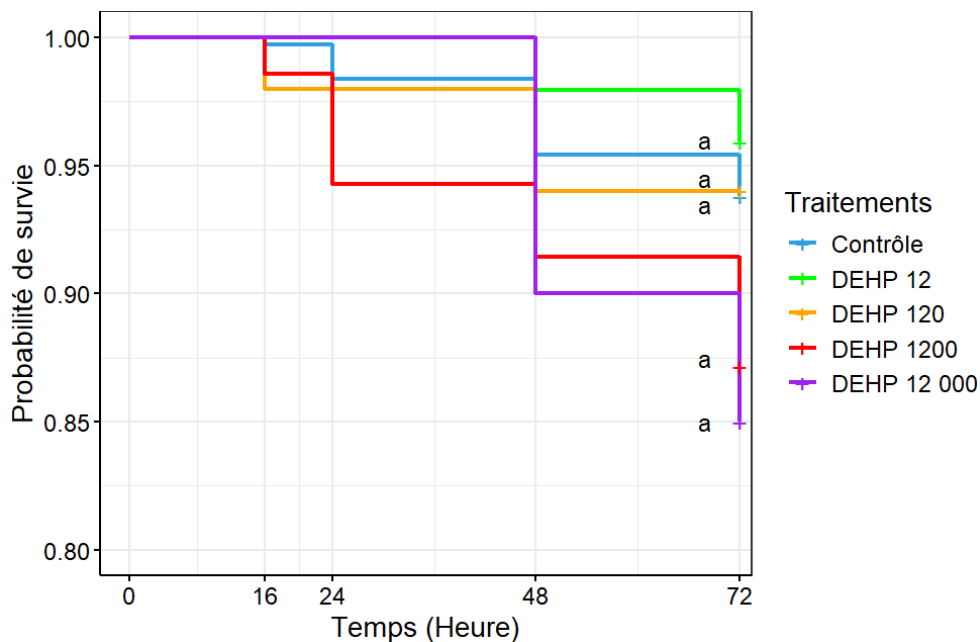


Figure 14 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières exposées aux traitements DEHP à doses environnementales (ng/g b.w) et au contrôle jusqu'à 72 heures après exposition. Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (nombre total d'ouvrières exposées à un des traitements = 559). Chaque étape correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment où toutes les ouvrières sont exposées. Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements ou contrôle (p -value > 0,05). Notons que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.80 – 1.00).

4.1.3. Effet des phtalates combinés sur la mortalité individuelle

Le taux de mortalité ne diffère pas significativement pour les ouvrières exposées de manière topicale aigüe au mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g. b.w par rapport au contrôle (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 0,2488$, $df = 1$, p -value = 0,6179). Cependant, le mélange composé de DnBP 600 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/ g b.w a un effet significatif sur la mortalité des ouvrières exposées par rapport au contrôle (BLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 4,7935$, p -value = 0,02857 ; Figure 15).

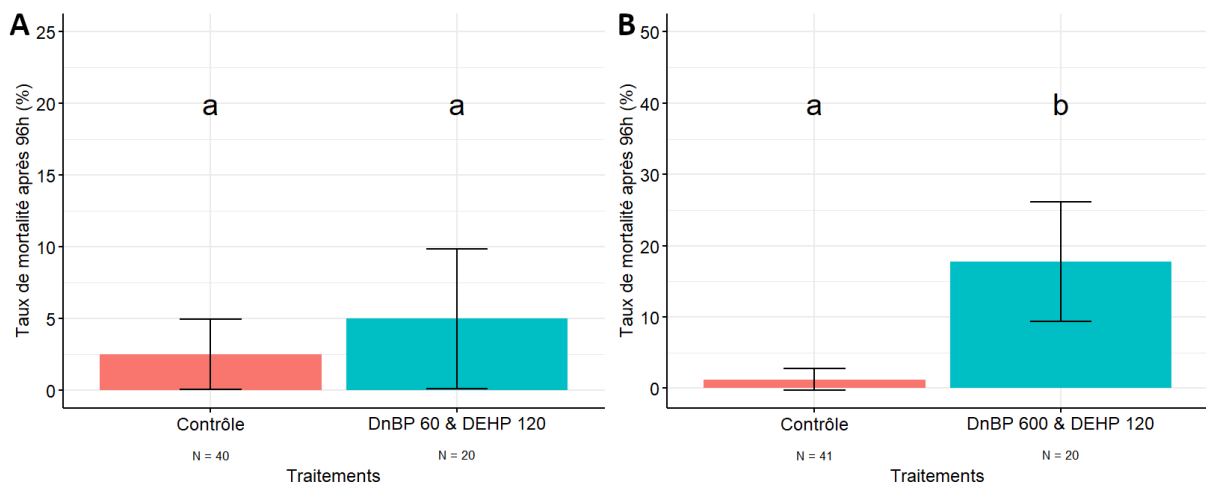


Figure 15 : Taux de mortalité (%) des ouvrières de *B. terrestris* 96 heures après exposition en fonction des traitements et des contrôles. A. Taux de mortalité des ouvrières exposées au contrôle ou au mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w. **B.** Taux de mortalité des ouvrières exposées au contrôle ou au mélange de DnBP 600 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w. Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard ; GLMM ou BLMM, famille binomiale). Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05.

4.2. À l'échelle coloniale

4.2.1. Mortalité

Sur les 400 ouvrières installées en microcolonies et exposées à leurs traitements respectifs, 73 ouvrières sont mortes durant l'expérience. Les microcolonies exposées aux DEHP 12 ng/g b.w sont celles ayant eu le taux de mortalité le plus élevé, avec environ 26% d'ouvrières mortes. Le DnBP 60 ng/g b.w est le traitement ayant le taux de mortalité le plus bas, avec 8 % d'ouvrières mortes (Tableau 6).

Tableau 6 : Pourcentage d'ouvrières mortes exposées après 35 jours d'expérience en fonction des traitements. Le pourcentage de mortalité (exprimé en pourcent) a été calculé comme suit : (ouvrières mortes / (ouvrières mortes + ouvrières vivantes)) *100. Les doses de DEHP et de DnBP seules ou en mélange sont exprimées en ng/g b.w. Nombre de microcolonie par traitement = 5.

Traitements	Contrôle rien	Contrôle eau	Contrôle solvant	DEHP 12	DEHP 120	DnBP 60	DnBP 600	DnBP 60 & DEHP 120
Pourcentage de mortalité (%)	17	25	13	26	25	8	20	12

Une seule ouvrière est morte 72 heures après la première exposition. Cette ouvrière provenait d'une microcolonie du contrôle rien (Annexe 3, Figure 24). Au 10^{ème} jour, le taux de survie des ouvrières exposées au DnBP 600 ng/g b.w a diminué rapidement (± 88 % de survie) et a ensuite lentement diminué pour arriver à un taux de survie de 80 % à la fin de l'expérience. A partir du 26^{ème} jour, le taux de mortalité des ouvrières exposées au DEHP 12 ng/g b.w, à l'eau ou au DEHP 120 ng/g b.w a augmenté. Concernant la survie des ouvrières exposées à un des autres traitements, celle-ci diminue petit à petit au cours de l'expérience (Figure 16). Cependant, l'exposition chronique des ouvrières n'a pas affecté significativement la mortalité de celles-ci, quel que soit le traitement (Régression de Cox, p -value = 0.1026).

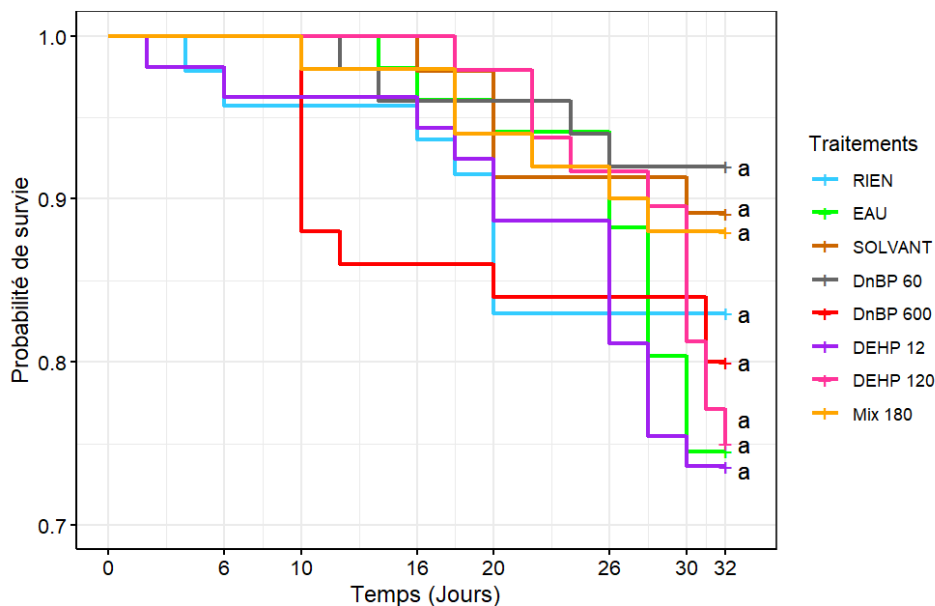


Figure 16 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières exposées à l'un des contrôles ou un des phtalate à doses environnementales (ng/g b.w). Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (nombre de microcolonie par traitement = 5). Chaque étape de la courbe de Kaplan-Meier correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment où toutes les ouvrières sont exposées. Le taux de mortalité est observé pendant 32 jours, tous les deux jours. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Aucune différence significative entre traitements n'a été observée. Notons que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.70 - 1.00).

4.2.2. Production du couvain

Tous les stades de développement de *B. terrestris* sont présents dans chaque traitement : les œufs, les larves non isolées, les larves isolées pré défécation, les larves isolées post défécation, les pupes, les mâles non émergés et les mâles émergés. Le nombre de larves éjectées a également été pris en compte dans les analyses.

4.2.2.1. Effets des traitements sur le nombre d'individus produits

Une moyenne du nombre total d'individus produits par les cinq microcolonies dans chaque traitement a été réalisée (Tableau 7). Le contrôle rien, correspondant aux microcolonies qui n'ont pas été exposées au froid ou à l'un des traitements, a produit en moyenne 215 individus, ce qui en fait la production la plus élevée. Les autres traitements ont produit quelques individus en moins par rapport à cette condition, avec 168 individus pour le DnBP 600 ng/g b.w, qui s'avère être la production d'individus la plus faible (Tableau 7). Cependant, aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements concernant le nombre d'individus total produits dans les couvains (GLMM, binomiale négative, $\chi^2 = 3,9197$, $df = 7$, p -value = 0,789).

Tableau 7 : Nombre moyen d'individus produits dans une microcolonie par traitement avec les erreurs standards (production moyenne \pm erreur standard). Les erreurs standards sont calculées comme suit : $\text{écart} - \text{type} / \sqrt{\text{nombre d'observations du traitement}}$. Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Nombre de microcolonies par traitement = 5.

Traitements	Contrôle RIEN	Contrôle EAU	Contrôle SOLVANT	DEHP 12	DEHP 120	DnBP 60	DnBP 600	DnBP 60 & DEHP 120
Nombre d'individus moyen dans un couvain	215 \pm 13	208 \pm 18	189 \pm 19	198 \pm 44	175 \pm 19	198 \pm 29	168 \pm 14	185 \pm 25

En analysant le nombre d'individus produits dans les différents stades de développement (Tableau 8), le nombre œufs produits par les microcolonies ne diffère pas significativement entre les traitements (GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 3,5574$, $df = 7$, p -value = 0,8291). Concernant le nombre de larves non isolées produites, aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements (GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 5,2092$, $df = 7$, p -value = 0,6345). Il en va de même pour le nombre de larves pré défécation (GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 8,7728$, $df = 7$, p -value = 0,2694) et le nombre de larves post défécation (GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 10,362$, $df = 7$, p -value = 0,169). Le nombre de pupes et de mâles non émergés produits dans les microcolonies ne varie pas significativement selon les traitements (respectivement GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 2,394$, $df = 7$, p -value = 0,9349 et GLMM, famille Poisson, $\chi^2 = 9,1895$, $df = 7$, p -value = 0,2393). Le nombre de mâles émergés renseigne une tendance non significative entre les traitements (GLMM, famille Poisson, $\chi^2 = 13,323$, $df = 7$, p -value = 0,06462). Après la réalisation d'un post-hoc à

comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, le contrôle solvant a une tendance non significative à diminuer le nombre de mâles émergés par rapport au contrôle rien (post-hoc, p -value = 0,0800). Le DEHP 120 ng/g b.w a quant à lui une tendance non significative à augmenter le nombre de mâles émergés par rapport au contrôle solvant (post-hoc, p -value = 0,0535). Enfin, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements concernant le nombre de larves éjectées (GLMM, binomiale négatif, $\chi^2 = 10,871$, $df = 7$, p -value = 0.1444).

Tableau 8 : Nombre moyen d'individus produits dans une microcolonie par stade de développement et par traitement avec les erreurs standards (production moyenne \pm erreur standard). Les erreurs standards sont calculées comme suit : $\text{écart - type} / \sqrt{\text{nombre d'observations du traitement}}$. Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Nombre de microcolonies par traitement = 5.

Traitements	Contrôle RIEN	Contrôle EAU	Contrôle SOLVANT	DEHP 12	DEHP 120	DnBP 60	DnBP 600	DnBP 60 & DEHP 120
Nombre moyen larves éjectées	14 \pm 7	4 \pm 1	6 \pm 1	6 \pm 2	6 \pm 2	8 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 2
Nombre moyen d'œufs	50 \pm 10	53 \pm 9	51 \pm 8	55 \pm 16	44 \pm 11	75 \pm 12	43 \pm 11	56 \pm 13
Nombre moyen larves non isolées	78 \pm 15	82 \pm 13	79 \pm 12	76 \pm 23	52 \pm 11	65 \pm 12	70 \pm 5	69 \pm 16
Nombre moyen larves pré défécation	27 \pm 7	26 \pm 5	18 \pm 3	20 \pm 5	25 \pm 4	26 \pm 7	15 \pm 3	16 \pm 5
Nombre moyen larves post défécation	6 \pm 2	6 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 2	10 \pm 4	11 \pm 3	3 \pm 1	6 \pm 1
Nombre moyen pupes	21 \pm 4	21 \pm 4	18 \pm 5	17 \pm 3	19 \pm 2	16 \pm 3	17 \pm 3	16 \pm 4
Nombre moyen mâles non émergés	2 \pm 0,8	1 \pm 0,2	1 \pm 0,6	3 \pm 0,7	2 \pm 0,4	1 \pm 0,3	2 \pm 1	1 \pm 0,4
Nombre moyen mâles émergés	17 \pm 2	15 \pm 2	10 \pm 2	15 \pm 2	18 \pm 1	13 \pm 3	13 \pm 3	15 \pm 1

4.2.2.2. Effets des traitements sur la masse du couvain et des individus

La masse totale des larves produites dans les couvains n'a pas révélé de différence significative entre les traitements (LMM, $\chi^2 = 3,8103$, $df = 7$ p -value = 0,8014 ; Figure 17).

À la suite des analyses statistiques, l'exposition chronique des ouvrières aux différents traitements n'a pas affecté significativement la masse des larves non isolées produites (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 11,36$, $df = 7$, p -value = 0,1237 ; Figure 18).

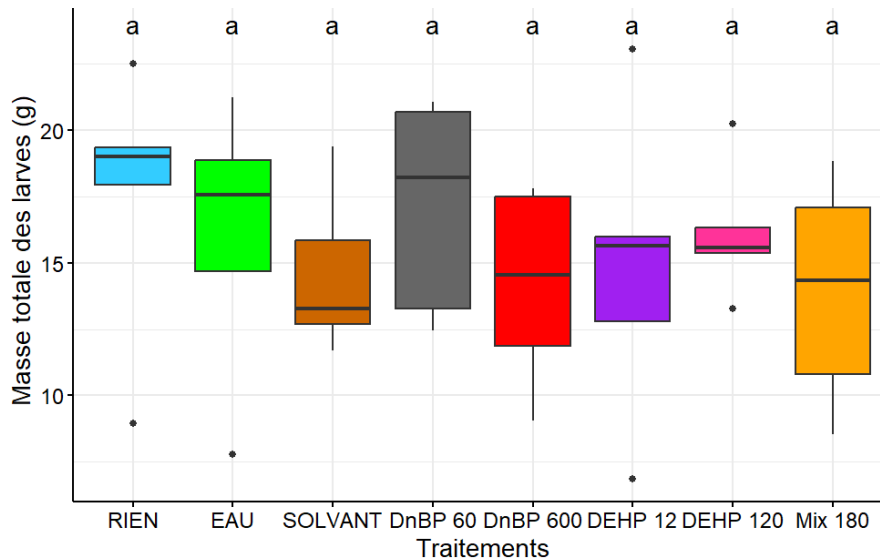


Figure 17 : Masse de l'ensemble des individus des stades larvaires produits par les microcolonies en fonction des traitements. Nombre de microcolonies par traitement = 5. Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Les lettres différentes au-dessus des boîtes de dispersion indiquent une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Les première, deuxième et troisième barres horizontales des boîtes de dispersion représentent respectivement le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Le minimum et le maximum sont indiqués par les deux barres verticales, sans tenir compte des valeurs extrêmes représentées par les points. Aucune différence significative n'a été détectée entre les traitements phtalates ou contrôles (LMM, p -value > 0,05).

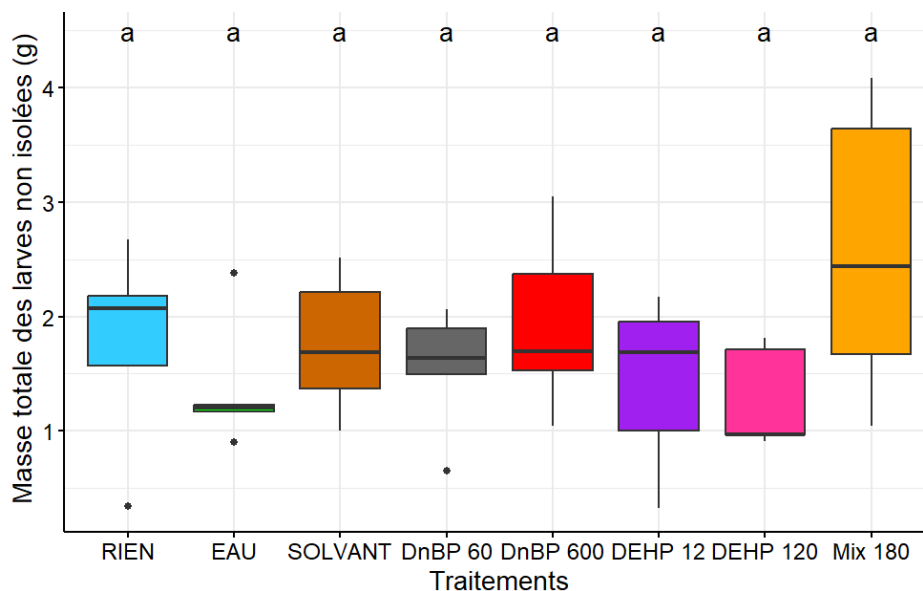


Figure 18 : Masse totale des larves non isolées en fonction des traitements (nombre de microcolonies par traitement = 5). Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Les différentes lettres indiquent s'il y a une différence significative entre les conditions à p -value < 0,05. Les première, deuxième et troisième barres horizontales des boîtes de dispersion représentent respectivement le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Le minimum et le maximum sont indiqués par les deux barres verticales, sans tenir compte des valeurs extrêmes représentées par les points. Aucune différence significative n'a été observée entre les traitements ou contrôles (GLMM, famille Gamma, p -value > 0,05).

La masse des individus larvaires pré défécation a différencié significativement selon le traitement (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 25,086$, $df = 7$, $p\text{-value} = 0,007325$; Figure 19 A). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, le DnBP 60 ng/g b.w a augmenté significativement la masse des larves par rapport au contrôle eau (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0015$), de même que le DnBP 600 ng/g b.w a augmenté leur masse par rapport au contrôle eau (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0248$). Cette comparaison multiple a également mis en évidence une différence significative entre deux traitements : une exposition des ouvrières au DnBP 60 ng/g b.w a augmenté significativement la masse des larves pré défécation par rapport au DEHP 120 ng/g b.w (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0389$). Enfin, une augmentation non significative de la masse de ces larves pour le traitement DEHP 12 ng/g b.w par rapport au contrôle eau a été observée (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0622$).

Aucune différence significative n'a été détectée concernant la masse des larves post défécation selon le traitement (LMM, $\chi^2 = 11,025$, $df = 7$, $p\text{-value} = 0,1375$; Figure 19 B).

La masse des pupes a varié significativement entre les traitements (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 22,567$, $df = 7$, $p\text{-value} = 0,0020$; ; Figure 19 C). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, il s'avère que le mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Mix 180) a augmenté significativement la masse des pupes par rapport au contrôle eau (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0310$). Une différence significative est également observée entre deux traitements. En effet, l'exposition des ouvrières au mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Mix 180) a augmenté significativement la masse des pupes produites par rapport au DEHP 120 ng/g b.w (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0222$). Enfin, une augmentation non significative de la masse des pupes pour le mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Mix 180) par rapport au DEHP 12 ng/g b.w a été observée (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0507$).

La masse des mâles non émergés n'a pas révélé de différence significative entre les traitements (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 8,8714$, $df = 7$, $p\text{-value} = 0,262$; ; Figure 19 D).

Enfin, la masse des mâles émergés diffère significativement entre les traitements (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 17,164$, $df = 7$, $p\text{-value} = 0,01637$; Figure 20). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, une diminution non significative de la masse est observée pour le traitement DEHP 12 ng/g b.w par rapport au solvant (post-hoc, $p\text{-value} = 0,0725$) et par rapport au mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Mix 180 ; post-hoc, $p\text{-value} = 0,0682$).

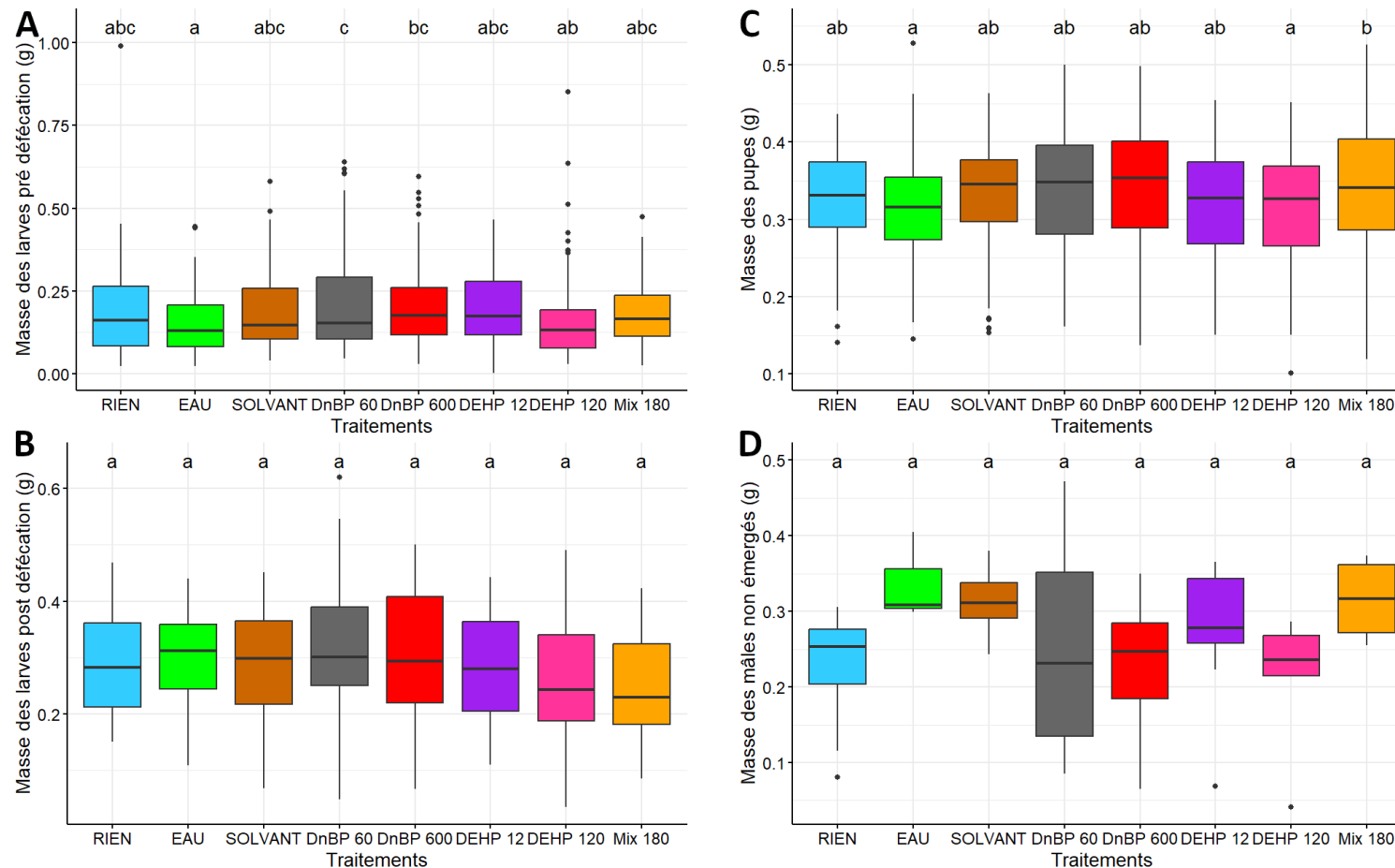


Figure 19 : Boîtes de dispersion représentant la masse (en grammes) des individus de quatre stades de développement de *B. terrestris* en fonction des traitements. A. Masse des larves pré défécation. B. Masse de larves post défécation. C. Masse des pupes. D. Masse des mâles non émergés. Nombre de microcolonies par traitement = 5. Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Les différentes lettres au-dessus des boîtes de dispersion indiquent s'il y a des différences significatives (p -value < 0,05) entre les traitements (GLMM Gamma ou LMM ; post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg quand p -value < 0,05). Les première, deuxième et troisième barres horizontales des boîtes de dispersion représentent respectivement le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Le minimum et le maximum sont indiqués par les deux barres verticales, sans tenir compte des valeurs extrêmes représentées par les points.

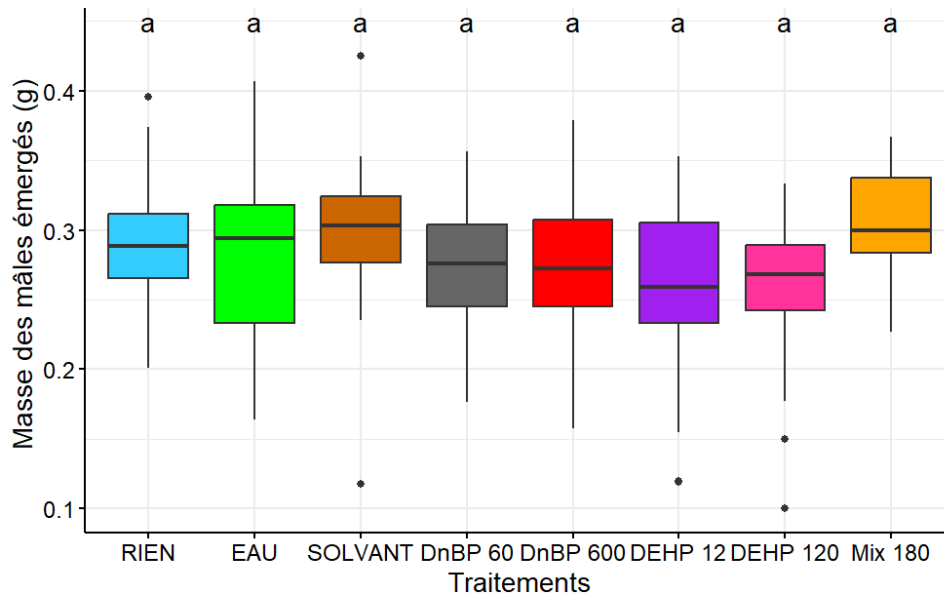


Figure 20 : Masse totale des mâles émergés en fonction des traitements (nombre de microcolonies par traitement = 5). Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Les lettres identiques au-dessus des boîtes de dispersion indiquent des différences non significatives entre traitements (GLMM, famille Gamma, p -value > 0.05). Les première, deuxième et troisième barres horizontales des boîtes de dispersion représentent respectivement le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Le minimum et le maximum sont indiqués par les deux barres verticales, sans tenir compte des valeurs extrêmes représentées par les points.

4.2.3. Consommation des ressources

Une exposition chronique des ouvrières à l'un des traitements n'affecte pas significativement leur consommation totale de pollen (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 8,2327$, $df = 7$, p -value = 0,3125 ; Figure 21 A). La consommation totale de sirop, quant à elle, diffère significativement selon le traitement (GLMM, famille Gamma, $\chi^2 = 14,95$, $df = 7$, p -value = 0,03664 ; Figure 21 B). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, il n'y a pas eu de différences significatives entre les traitements et les contrôles. Cependant, une différence significative entre les traitements phtalates a été révélée par ce test : seule la consommation de sirop des ouvrières exposées au DEHP 12 ng/g b.w diffère de celles exposées au mélange de DnBP 60 ng/g b.w & de DEHP 120 ng/g b.w (Mix 180 ; post-hoc, p -value = 0,0216).

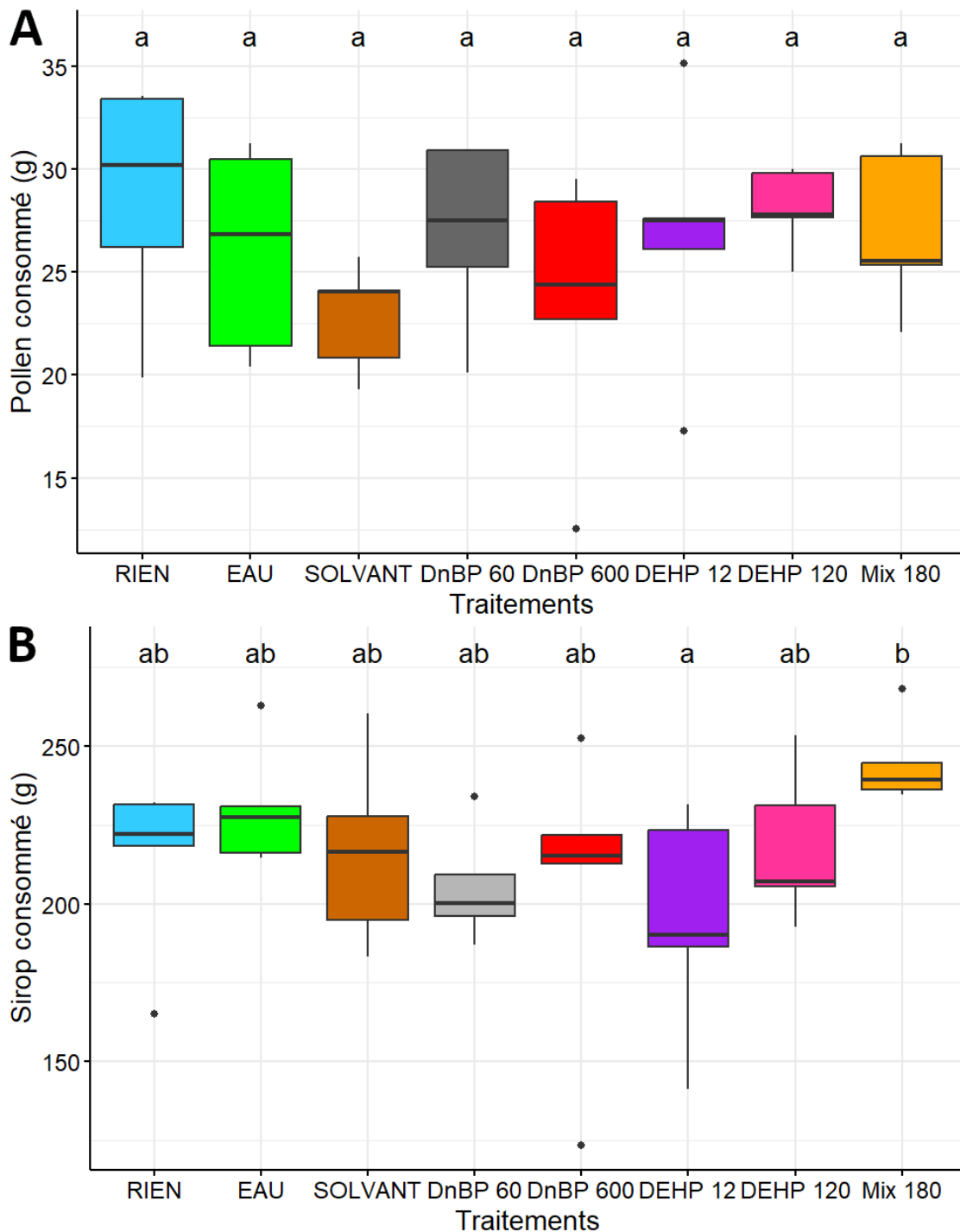


Figure 21 : Consommation des ressources (en grammes) des microcolonies sur les 35 jours d'expérience, en fonction des traitements (nombre de microcolonies par traitement = 5). **A.** Masse du pollen consommé par les microcolonies. **B.** Masse du sirop consommé par les microcolonies. Les traitements phtalates sont exprimés en ng/g b.w. Le traitement « Mix 180 » représente le phtalate mixte DnBP 60 ng/g bw & DEHP 120 ng/g b.w. Les différentes lettres au-dessus des boîtes de dispersion indiquent s'il y a des différences significatives (p -value < 0,05) entre les traitements (GLMM et Post-hoc à comparaisons multiples par paires à Post-hoc à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg). Les première, deuxième et troisième barres horizontales des boîtes de dispersion représentent respectivement le premier quartile, la médiane et le troisième quartile. Le minimum et le maximum sont indiqués par les deux barres verticales, sans tenir compte des valeurs extrêmes représentées par les points.

Chapitre 5 : Discussion des résultats

Dans cette étude, nous avons exploré les effets du DnBP et du DEHP à des doses environnementales sur la mortalité, la production d'individus mâles et la consommation de ressources par *B. terrestris*. Le taux de mortalité a été étudié dans des conditions d'élevage individuelles et sociales, alors que la production et la consommation ont été uniquement étudiées en conditions d'élevage sociales. Les effets des doses de DnBP de 6 ng/g b.w à 6 000 ng/g b.w pour les conditions individuelles et les effets des doses de DnBP 60 ng/g b.w et 600 ng/g b.w pour les conditions sociales ont été analysés. Les effets des doses de DEHP de 12 ng/g b.w à 12 000 ng/g b.w pour les conditions d'élevage individuelles et les effets des doses de DEHP 12 ng/g b.w et 120 ng/g b.w pour les conditions d'élevage sociales ont été analysés. Enfin, des mélanges de phtalates mixtes ont été utilisés (DnBP 60 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w pour les deux conditions d'élevage ; DnBP 600 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w pour l'élevage individuel) afin d'étudier leurs effets.

5.1. Mortalité à l'échelle individuelle

5.1.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle

Dans notre étude, les taux de mortalité les plus élevés ont été observés à des doses environnementales à concentration moyenne (DnBP 60 ng/g b.w et DnBP 600 ng/g b.w ; Figure 11 et Figure 12). En revanche, la plus faible dose environnementale (DnBP 6 ng/g b.w) et la plus haute dose environnementale testées (DnBP 6 000 ng/g b.w) n'ont pas induit d'effets significatifs sur la survie des ouvrières de *B. terrestris* (Figure 12). La mortalité liée au DnBP a également été étudiée chez d'autres espèces. C'est le cas d'un invertébré terrestre, le collembole *Folsomia fimetaria*, chez qui le DnBP réduit le taux de survie des adultes à partir de 250 mg/kg de poids sec de sol et cause la mort de presque tous les individus à 500 mg/kg de poids sec (Jensen et al., 2001). Cependant, chez des espèces aquatiques telles que le Crabe gazami *Portunus trituberculatus*, il a été observé que le DnBP n'a pas eu d'effets significatifs sur le taux de mortalité des adultes de cette espèce (0,2, 2 et 10 mg/L de DnBP ; He et al., 2022). Ce phtalate, à doses de 1-10 μ M, n'a pas non causé de mortalité chez les juvéniles de *D. magna* exposés pendant 48 heures (Seyoum & Pradhan, 2019).

Le champ de la recherche sur l'impact des phtalates est très large. Que ce soit au niveau des espèces étudiées, des doses de phtalate administrées ou des modes d'exposition, les possibilités sont multiples. De quoi aboutir à des résultats eux aussi très différents. Au sein de notre seule étude, nous avons obtenu des résultats sensiblement différents selon les concentrations de phtalates auxquelles ont été exposées les ouvrières. Mais au-delà de ces variations, c'est ce résultat

à l'allure en forme de cloche caractéristique du profil de toxicité et d'activité non monotone du DnBP qui a été mis en évidence (Figure 11). Cela fait écho à l'approche utilisée par de plus en plus d'études ces dernières années. Cette impossibilité de prévoir les effets engendrés sur base de la dose administrée est investiguée par un nombre croissant de chercheurs pour se concentrer sur l'activité de perturbateurs endocriniens attribuée aux phtalates (Lagarde et al., 2015).

Jusqu'il y a peu, les études menées sur la toxicité des phtalates se concentraient sur la détermination de la dose létale (LD50) ou de la concentration létale (LC50) causant la mort de 50% des individus exposés (Staples et al., 1997 ; Heudorf et al., 2007). D'autres études ont également essayé de déterminer la concentration efficace médiane (CE50), représentant la concentration à laquelle 50% de l'effet maximale d'une substance est observée (Staples et al., 1997). Ces études ont été principalement réalisées sur les organismes aquatiques (Staples et al., 1997). Par exemple, chez *D. magna*, la LC₅₀ a été déterminée en plaçant des adultes pendant 24 heures et 48 heures dans de l'eau contaminée au DnBP à une concentration de 4,92 et 4,31 mg/L respectivement (Shen et al., 2019). La LC₅₀ a également été déterminée chez les nouveau-nés de cette espèce (âgées de moins de 24 heures). Elle atteint des valeurs de 3,48 et 2,83 mg/L pour des expositions de 24 heures et 48 heures respectivement (Shen et al., 2019). Les stades plus jeunes semblent ainsi être plus sensibles aux expositions de DnBP (Shen et al., 2019).

5.1.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle

Contrairement au DnBP, le DEHP ne semble pas présenter un profil de toxicité et d'activité non monotone (Figure 13). De plus, le DEHP n'a pas eu d'effets significatifs sur la mortalité quelle que soit la dose et n'affecte donc pas la survie des ouvrières placées dans des conditions d'élevage individuelles (Figure 13 et Figure 14). Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par d'autres études sur l'absence de mortalité significative chez d'autres espèces d'invertébrés. C'est le cas par exemple du collembole *F. fimetaria*, chez qui les expositions à différentes doses de DEHP (1 000 – 5 000 mg/kg de poids sec de sol) n'affectent ni la mortalité des adultes, ni des juvéniles (Jensen et al., 2001). C'est également le cas pour la larve aquatique *C. riparius* dont la survie n'a pas été affectée par une exposition aiguë à court terme (pendant 24 heures), même à des concentrations de DEHP élevées (0,01 à 100 mg/L ; Planelló et al., 2011). Une étude menée sur des juvéniles de *D. magna* a montré qu'une exposition au DEHP (1-10 µM) pendant 48 heures n'a causé aucune mortalité chez ceux-ci (Seyoum & Pradhan, 2019). Une exposition durant 48 heures du copépode *Parvocalanus crassirostris* n'a pas non plus affecté la survie des adultes à des doses de DEHP allant jusque 5120 µg/L par rapport au témoin (Heindler et al., 2017). Cependant, chez les mêmes espèces, la survie des nauplii a significativement été affectée par l'exposition au DEHP, même à des concentrations environnementales (0,06 ng/L à 1953,13 ng/L), montrant ainsi la sensibilité

différenciée aux phtalates des différents stades de développement, bien que les concentrations utilisées pour l'exposition des nauplii soient plus faibles que celles des adultes (Heindler et al., 2017). D'autres études ont également montré que le DEHP pouvait induire de la mortalité chez certaines espèces. C'est le cas chez *D. magna*, chez qui une exposition chronique à une dose de 811µg/L induit une surmortalité (Knowles et al., 1987) et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* pour qui une exposition topique et chronique de 14 jours induit une surmortalité à une dose de 1 µM de DEHP (Pradhan et al., 2017). Très peu d'études se sont intéressées au taux de mortalité chez les insectes terrestres. Une étude menée sur les larves de *S. littoralis* montre qu'une exposition chronique au DEHP à 4,3 mg/g d'aliments a provoqué une mortalité environ 30 % plus élevée par rapport au contrôle (Avilès et al., 2019). Cette même dose a induit la mort de 36 % des individus au stade nymphal (Avilès et al., 2019). Cependant, il est important de noter que cette étude a été menée sur des larves et qu'elles ont été exposées au traitement par voie orale. Une autre étude sur cette même espèce montre que le DEHP à des concentrations de 100 ng/g et 10 µg/g n'a pas affecté la mortalité des adultes. Dans cette étude, les adultes ont également été exposés au DEHP par voie orale et ces doses sont plus faibles que l'étude précédente sur les larves de cette espèce (Humann-Guillemot et al., 2024). Notre étude s'est pour sa part portée sur des individus adultes exposés de façon topicale. L'effet du DEHP sur la mortalité des organismes, tout comme le DnBP, semble donc être variable en fonction de l'espèce exposée, du stade de développement de celle-ci, de la fréquence et du temps d'exposition à la molécule.

5.1.3. Effet des phtalates combinés sur la mortalité individuelle

Dans notre étude, nous avons également investigué la toxicité du DnBP et du DEHP en mélange sur les ouvrières de *B. terrestris* en conditions individuelles car ces deux molécules semblent être les plus présentes dans l'environnement (Xie et al., 2006) mais surtout parce qu'elles ont été retrouvées ensemble sur les cuticules de bourdons de la ville de Lille pendant des campagnes du projet ASPI en 2021 (données en cours de publication). De plus, les organismes sont rarement exposés à un polluant isolé : les profils d'analyse de l'environnement pour les phtalates révèlent souvent la présence de plusieurs phtalates simultanément (Lenoir et al., 2012). Dans notre étude, le mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w n'a pas impacté significativement la mortalité des ouvrières exposées par rapport au contrôle (Figure 15). Au-delà de l'effet démontré du DnBP 60 ng/g b.w sur la mortalité des ouvrières, son impact sur la survie des ouvrières n'apparaît donc pas comme significatif lorsqu'il est en mélange avec une dose d'un autre phtalate. En revanche, nos résultats indiquent que le mélange de DnBP 600 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w a provoqué un taux de mortalité des ouvrières significativement plus élevé par rapport au contrôle (Figure 15). Nous avons pu voir que le DnBP 600 ng/g b.w seul diminuait significativement la survie des ouvrières exposées (Figure 12) et que le DEHP 120 ng/g b.w seul

n'affectait pas la survie des ouvrières (Figure 14). Un taux de mortalité significatif des ouvrières exposées à ces doses mélangées pourrait être expliqué par la toxicité du DnBP 600 ng/g b.w. Une étude menée sur *S. littoralis* a montré qu'une exposition par voie orale d'un mélange de DEHP et de cadmium à de faibles et fortes doses impacte significativement la mortalité des adultes (Humann-Guillemot et al., 2024). Alors que dans cette même étude, le cadmium à faibles et fortes doses diminue significativement la mortalité des adultes de *S. littoralis* mais le DEHP à faibles et fortes doses n'impacte pas significativement la mortalité des adultes de cette espèce (Humann-Guillemot et al., 2024). Dans notre étude et celle de Humann-Guillemot et collègues (2024), le DEHP seul ou en mélange avec une autre substance ne semble pas impacter la mortalité des individus adultes exposés et ne semble donc pas être toxique pour ces deux espèces.

5.2. À l'échelle coloniale

5.2.1. Mortalité

Contrairement à l'expérience en conditions d'élevage individuelle, aucune ouvrière n'est morte dans les 72 heures suivant la première exposition, hormis une ouvrière provenant d'une microcolonie du contrôle rien. (Annexe 3, Figure 24). De plus, sur les 32 jours d'expérience suivant la première exposition topicale, nous avons montré qu'il n'y a pas eu de différence significative entre la mortalité issue du contrôle rien et celles découlant des autres contrôles ou traitements. Le contrôle rien était la seule condition n'ayant pas subi d'exposition au froid et à un des traitements. Les microcolonies peuvent jouer un rôle tampon lorsqu'elles sont exposées au froid et/ou à une autre source de stress, ce qui pourrait expliquer cette absence de différence significative entre les microcolonies du contrôle rien avec les autres microcolonies (Easton-Calabria et al., 2023). En outre, à l'inverse des expositions en conditions d'élevage individuelles, le DnBP 60 ng/g b.w et le DnBP 600 ng/g b.w n'ont pas eu d'effets significatifs sur le taux de mortalité des ouvrières en microcolonies (Figure 16). L'effet tampon pourrait donc diminuer la toxicité du DnBP face aux doses les plus susceptibles d'augmenter le taux de mortalité, même par contact répété (exposition chronique une fois par semaine dans le cadre de cette expérience). Cet effet tampon a été observé pour d'autres molécules telles que les néonicotinoïdes sur les espèces sociales (Crall et al., 2019 ; Easton-Calabria et al., 2023).

Comme pour les expositions des individus isolés, le mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w n'a pas montré d'impact significatif sur le taux de survie des ouvrières (Figure 16). Le DEHP 12 ng/g b.w et le DEHP 120 ng/g b.w en doses seules n'ont pas non plus eu d'effets significatifs sur la survie des microcolonies. Cependant, l'expérience sur les microcolonies exposées aux mêmes doses de phtalates réalisée par des mémorants ayant travaillé sur le projet ASPI a révélé une mortalité significativement plus élevée au traitement DEHP 120 ng/g b.w et au

traitement cocktail DnBP 60 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w (Terzo, 2023). Une hypothèse pouvant expliquer cette différence serait que la saison d'exposition aux différents traitements et contrôles agisse différemment sur les individus, provoquant des perturbations physiologiques et un taux de mortalité plus élevée d'une saison à l'autre. Une étude sur *A. mellifera* a montré que les effets d'une exposition à une substance (l'acétone dans cette étude) varient selon la saison, cela pourrait être lié à l'interférence des différentes saisons sur leur cycle biologique (Desclos le Peley et al., 2024). L'expérience de Terzo (2023) sur les microcolonies de *B. terrestris* a été réalisée en décembre 2022, alors que notre expérience a été réalisée en mars 2024. Il est possible que les traitements utilisés durant les expériences aient eu un impact plus important sur la mortalité des ouvrières en décembre qu'en mars, décembre étant la période où les bourdons ne sont pas en activité et où les reines hibernent en conditions naturelles (Sharma et al., 2021). Mars est le tout début de la saison des abeilles sauvages, l'impact des phtalates sur la mortalité pourrait être moins important. De plus, les colonies mères *B. terrestris* provenant de Biobest® utilisées pour les expériences sont des bourdons d'élevage artificiels. Le mode et le cycle de vie des espèces d'élevage comme *B. terrestris* sont contrôlées et modifiées par rapport aux espèces sauvages (Sharma et al., 2021). Casser le cycle de vie, modifier la diapause de la reine, en plus de la saisonnalité, pourrait avoir un impact sur le taux de mortalité des ouvrières exposées aux phtalates et expliquer cette différence de résultats. En effet, une étude montre qu'une modification du temps de diapause de la reine et de la température modifie le taux de survie de la colonie ainsi que sa production de larves (Nasir et al., 2019).

5.2.2. Production du couvain

5.2.2.1. Effets des traitements sur le nombre d'individus produits

Il est connu que les phtalates provoquent des troubles de la reproduction, aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (Jobling et al., 1995 ; Staples et al., 1997). Cependant, dans notre étude, à la suite de l'exposition chronique des ouvrières de *B. terrestris* à l'un des traitements, le nombre total de larves produites dans les différents stades larvaires ne diffère pas significativement entre les traitements. Les doses seules de DnBP, de DEHP et le mélange de ces deux phtalates ne semblent pas affecter la fertilité des ouvrières de *B. terrestris*. D'autres études indiquent également que certains phtalates n'affectent pas la fécondité ou le taux de reproduction chez les invertébrés exposés. Le DEHP à concentration de 1 000 mg/kg de poids sec de sol à 5 000 mg/kg de poids sec de sol n'a pas d'effets sur la reproduction des collemboles *F. fimetaria* (Jensen et al., 2001). Chez le copépode estuarien *Eurytemora affinis*, la fécondité n'a pas été affectée par une exposition de 10 jours au DEHP allant jusqu'à 109 ng/mL (Forget -Leray et al., 2005). Chez *D. magna*, les œufs ont été exposés à l'un des trois phtalates (DEP, DnBP ou DEHP) et l'éclosion de

ces œufs n'a pas été affectée par ces traitements (Seyoum & Pradhan, 2019). Chez cette même espèce, une exposition à 1 et 10 μM de DnBP ou de DEP n'a pas altéré la reproduction des daphnies, contrairement au DEHP 1 μM qui augmente la reproduction par rapport au témoin (Seyoum & Pradhan, 2019).

Cependant, dans une expérience similaire à la nôtre réalisée par Terzo (2023), tous les traitements phtalates ainsi que les contrôles eau et contrôle solvant montrent une diminution du nombre total des différents stades larvaires par rapport au contrôle rien (Terzo, 2023). Les microcolonies de ce dernier contrôle sont les seules à ne pas avoir été endormies au froid. Cette diminution de production des couvains dans les différents traitements et contrôle par rapport à celui-ci peut être expliquée par le fait que les abeilles (hormis le contrôle rien) ont été soumises à un stress lié au froid, malgré l'effet tampon de la microcolonie (Owen et al., 2013). Toutefois, nos microcolonies exposées à l'un des différents traitements ou contrôles ont également été endormies de la même manière au froid par rapport à l'expérience de Terzo (2023). Nous suggérons donc que les ouvrières issues de nos colonies mères ont été plus résistantes au froid que celles issues des colonies mères de Terzo (2023). Une hypothèse supplémentaire et plus probable serait que la saison d'exposition à l'un des traitements ou contrôles ait un impact sur le métabolisme des abeilles comme expliqué précédemment (Desclos le Peley et al., 2024). Ainsi, la diminution du nombre de larves produites par les microcolonies de Terzo (2023) pourrait s'expliquer par le fait que l'exposition ait eu lieu en décembre, période où les abeilles sauvages (ex. bourdons) sont en inactivité, alors que nos expériences ont eu lieu en mars (2024), début de la saison d'activité des abeilles sauvages.

Le nombre de larves éjectées par traitement au sein des microcolonies a également été dénombré et comparé pour évaluer le stress de la microcolonie causé par les traitements. Aucune différence concernant ce nombre d'éjections larvaires n'a été observée, suggérant que l'impact des phtalates en microcolonies n'affecterait pas le comportement d'éjections larvaires des ouvrières.

5.2.2.2. Effets des traitements sur la masse du couvain et des individus

La masse totale des couvains de *B. terrestris* n'est pas significativement différente en fonction des traitements (Figure 17). Terzo (2023) a pourtant détecté une différence de masse entre le traitement mixte de DnBP 60 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w et le contrôle rien (Terzo, 2023). La différence entre ces deux résultats peut sûrement s'expliquer par le fait que dans son expérience, Terzo (2023) a eu une mortalité plus élevée et significative entre ces deux molécules ou par le fait qu'une production de larves était plus faible pour le traitement phtalate mixte par rapport au contrôle rien (Terzo, 2023). Dans notre cas, le taux de mortalité est similaire entre ces deux

traitements. Nous avons également montré que les phtalates n'avaient pas d'effets significatifs sur la production du nombre d'individus. En conséquence, les différences constatées entre les deux expériences pourraient s'expliquer par le taux élevé de mortalité chez les ouvrières, affectant le nombre de larves produites chez Terzo (2023).

Malgré une différence non significative de la masse totale des couvains en fonction des traitements dans notre expérience, la masse de certains stades larvaires varie selon les traitements. Une explication plausible serait que la masse et le nombre de certains stades larvaires compensent ces différences de masse détectées dans les traitements ou les contrôles chez d'autres stades larvaires, ce qui amènerait à ne plus détecter de différences significatives concernant la masse totale des couvains en fonction des traitements. Les deux doses individuelles de DnBP augmentent la masse des larves pré défécation par rapport au contrôle eau (Figure 19 A). Le DEHP à concentration de 120 ng/g b.w diminue quant à lui la masse de ces larves par rapport au DnBP 60 ng/g b.w (Figure 19 A). La masse des pupes a également été augmentée par l'un des traitements. En effet, le mélange de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w a augmenté la masse de ces pupes par rapport au contrôle eau et au DEHP 120 ng/g b.w (Figure 19 C).

Dans une expérience similaire à la nôtre, l'exposition chronique des ouvrières de *B. terrestris* à l'un des traitements ou contrôles a révélé d'autres effets des phtalates sur certains stades de développement (Terzo, 2023). En effet, une exposition au DnBP 600 ng/g b.w a augmenté la masse des larves post défécation produites par rapport au DEHP 120 ng/g b.w. De plus, le DnBP 600 ng/g et le DnBP 60 ng/g b.w ont augmenté la masse des pupes produites par rapport au DEHP 120 ng/g b.w. En outre, le DEHP 120 ng/g b.w a réduit la masse de ces pupes par rapport au DEHP 12 ng/g b.w. Enfin, la masse des mâles non émergés se trouve augmentée par rapport au contrôle rien lorsque les ouvrières sont exposées au DnBP 600 ng/g (Terzo, 2023). Dans notre étude et celle réalisée par Terzo (2023), les doses de DnBP semblent induire une augmentation de la masse des larves de certains stades de développement. L'exposition des ouvrières de *B. terrestris* n'a toutefois pas révélé de différences significatives de la masse des stades larvaires entre le DEHP et les contrôles (rien, solvant ou eau), mais a révélé des différences significatives dans certains stades de développement entre le DEHP et d'autres doses de DEHP ou de DnBP. Dans une étude réalisée par Avilès et collègues (2019) sur *S. littoralis*, le DEHP à plus forte concentration (39,5 mg/g d'aliment) a eu également un impact significatif sur le poids des larves exposées par rapport aux autres conditions (contrôle et autres doses de DEHP), en diminuant celui-ci. Cette diminution de la masse corporelle due au DEHP a surtout eu lieu dans les deux derniers stades larvaires de la noctuelle (Avilès et al., 2019). Il est important de savoir que dans l'étude d'Avilès et collègues (2019), les larves ont directement été exposées au traitement par voie orale alors que dans notre étude et celle de Terzo (2023), l'exposition a été réalisée par application topique sur des adultes.

Une étude réalisée sur *D. melanogaster* a mis en évidence que l'impact transgénérationnel du DEHP sur la masse corporelle des drosophiles dépend de plusieurs facteurs tels que la période d'exposition, le sexe des parents exposés au DEHP et de la dose utilisée (Chen et al., 2019). Une exposition à long terme et à de fortes doses de DEHP chez la drosophile mère diminue le poids corporel de la progéniture, alors qu'une exposition du père dans les mêmes conditions augmente la masse corporelle de la progéniture (Chen et al., 2019). Les différences observées concernant les effets des phtalates dans notre étude et dans d'autres études pourraient en fonction de ces facteurs. Ces effets pourraient également varier en fonction du type d'exposition, du stade de développement exposé à une dose ou encore de l'espèce exposée.

Les deux études sur les expositions d'ouvrières de *B. terrestris* ont mis en évidence l'effet obésogène du DnBP sur certains stades larvaires. Les doses de DnBP 60 ng/g b.w et 600 ng/g b.w DnBP ont augmenté la masse des larves pré défécation et la masse des pupes (Figure 19 A et Figure 19 C). Le DnBP 600 ng/g b.w a également augmenté la masse des larves post défécation ainsi que celles des mâles non émergés (Terzo, 2023). L'exposition de *D. magna* à l'état juvénile et à des concentrations de 1 et 10 μ M augmente la teneur en lipides dans ces organismes. Tout comme le DnBP, le DEHP et le DEP augmentent également leur teneur en lipides (Seyoum & Pradhan, 2019). Une explication serait que ces phtalates inhibent l'absorption des acides gras et le catabolisme, augmentant ainsi la teneur en lipides à l'intérieur de l'organisme (Seyoum & Pradhan, 2019). L'augmentation de la masse des individus de certains stades larvaires due au DnBP pourrait également être expliquée par ce processus. Chez les abeilles, les corps gras (les tissus les plus lipidiques) jouent plusieurs rôles essentiels, notamment de stockage, de métabolisme et immunitaire (Law & Wells, 1989). Le DnBP inhiberait le processus de catabolisme des acides gras dans les corps gras, ce qui augmenterait ainsi la masse des individus des stades larvaires impactés. Pour vérifier cela, une vérification de l'immunité des individus serait nécessaire car une modification du taux de corps gras pourrait indiquer une réaction immune de l'organisme (Rosales, 2017).

5.2.3. Consommation des ressources

La consommation par les ouvrières des différents traitements et contrôles a également été prise en compte dans les analyses (Figure 21). Concernant la consommation de sirop par les microcolonies, les ouvrières exposées au traitement mixte de DnBP 60 ng/g b.w et de DEHP 120 ng/g b.w ont consommé significativement plus de sirop que le DEHP 12 ng/g b.w. Le DEHP 12 ng/g b.w est le traitement ayant eu le taux de mortalité des ouvrières plus important, même si ce taux n'est pas significativement différent des autres conditions. Il ne faut cependant pas exclure la possibilité des phtalates à modifier la consommation de nourriture. Ce qui pourrait expliquer

cette consommation plus faible de sirop et la consommation la plus élevée de sirop par les ouvrières exposées au mélange de phtalates. Concernant la consommation de pollen par les microcolonies, les phtalates ne semblent pas augmenter ou diminuer significativement la consommation de candies par les microcolonies en comparaison avec les différents contrôles ou les doses de phtalates. Le fait que les individus exposés à un traitement/contrôle ne changent pas leurs habitudes de consommation de pollen par rapport à d'autres individus exposés à un autre traitement/contrôle pourrait renforcer l'hypothèse de l'effet obésogène du DnBP sur certains stades larvaires de *B. terrestris*, malgré le nourrissage *ad libitum* des microcolonies. Cependant, en ce qui concerne le DEHP, l'étude réalisée par Avilès et collègues (2019) indique que des doses faibles et intermédiaires de ce phtalate (1,1 µg à 4.3 mg par gramme d'aliment) augmentent la consommation des larves de *S. littoralis* alors que la dose de DEHP la plus élevée non pertinente pour l'environnement (39,5 mg/g d'aliment) diminue significativement la consommation de nourriture de ces larves (Avilès et al., 2019). Notre étude est légèrement différente de celle-ci (exposition des adultes par application topique), ce qui pourrait expliquer cette différence observée dans la consommation de nourriture. Le DEHP ou un autre phtalate pourrait avoir un impact négatif sur le métabolisme de ces deux insectes terrestres, mais les impacteraient différemment selon le mode d'exposition (orale ou topique). Les larves de *S. littoralis* étant exposées au phtalate par la contamination de sa nourriture, le polluant pourrait avoir des impacts directs sur le métabolisme des larves et provoquer une altération de la digestion ou une malabsorption des aliments. Les larves auraient compensé cette baisse d'apport nutritif par une consommation élevée de nourriture (Avilès et al., 2019). Dans notre étude, les ouvrières de *B. terrestris* ont été exposées par application topique. Les phtalates ne sont pas en contact direct avec les voies digestives et pourraient donc concentrer leurs effets sur d'autres voies, comme les voies hormonales, n'impactant pas la consommation de nourriture des ouvrières.

5.3. Perspectives

L'exposition par application topique des ouvrières de *B. terrestris* en conditions d'élevage individuelles nous montre donc que le DnBP, à certaines doses environnementales, impacte les ouvrières isolées n'ayant pas accès à l'effet tampon de la microcolonie. De ce fait, il serait intéressant d'étudier ces doses de DnBP sur des espèces solitaires telles qu'*Osmia bicornis* afin d'en évaluer leur toxicité. Tout comme *B. terrestris*, *O. bicornis* est de plus en plus utilisée en laboratoire pour évaluer la toxicité et les effets sublétaux de certains produits chimiques tels que des pesticides (Mokkapatil et al., 2022).

L'impact du DnBP et du DEHP seuls ou en mélange et à des doses environnementales sur la mortalité ainsi que les effets sublétaux sur des ouvrières ont été investigués en conditions individuelles et sociales. Il serait intéressant d'étudier, dans les deux conditions d'élevage, l'effet

d'autres phtalates : le DnBP et le DEHP ne sont pas les seuls à se retrouver dans l'environnement, bien qu'ils soient les plus présents (Xie et al., 2006). D'autres phtalates tels que le DiBP et le DEP ont ainsi été retrouvés sur les cuticules de différentes espèces de fourmis (Lenoir et al., 2012). Ces phtalates pourraient également se retrouver sur la cuticule des abeilles et avoir des effets néfastes sur celles-ci. L'exposition par application cutanée en conditions individuelles a permis de mettre en évidence l'effet d'un mélange de phtalates sur la mortalité des ouvrières, celui du DnBP 600 ng/g b.w mélangé au DEHP 120 ng/g b.w. Il serait intéressant d'également étudier l'effet d'autres phtalates en mélange et à différentes doses car ceux-ci ne sont pas trouvés seuls dans l'environnement. De plus, ces doses mélangées pourraient, en plus du DnBP 600 ng/g b.w mélangé au DEHP 120 ng/g b.w, être également testées en microcolonies afin de comparer leurs effets en conditions sociales et individuelles. Ces doses seraient aussi bien testées pour évaluer le taux de mortalité que les effets sublétaux des individus exposés. Il est également important de garder à l'esprit que d'autres molécules ayant des impacts importants sur les abeilles telles que des pesticides ou des éléments traces métalliques (Alston et al., 2007 ; Gekière et al., 2023) pourraient engendrer des effets cocktails avec les phtalates et impacter négativement ces abeilles. Par exemple, le cadmium et le DEHP sont deux molécules présentes dans les mêmes environnements ; une exposition orale des adultes de *S. littoralis* a impacté significativement leur mortalité (Humann-Guilleminot et al., 2024) et pourrait donc également impacter les abeilles sauvages. Ces mélanges avec ces autres molécules seraient aussi à investiguer.

L'exposition par application topique et chronique des ouvrières en conditions sociales a permis de mettre en évidence les effets des phtalates sur la génération suivante en matière de production larvaire, que ce soit en ce qui concerne le nombre de larves ou la masse totale de l'effectif. Certains stades larvaires ont été significativement impactés par les divers phtalates utilisés. Mais il serait aussi intéressant d'exposer directement les différents stades larvaires des abeilles à l'un des différents phtalates et à des doses différentes et d'en observer les effets. Cette perspective permettrait de mimer une exposition non transgénérationnelle (directement sur l'individu larvaire) car il a été démontré que les matrices lipidiques telles que la cire des ruches d'*A. mellifera* entourant les larves contiennent des phtalates, ce qui pourrait directement affecter les larves (Gómez-Ramos et al., 2016). En outre, cela permettrait d'explorer les effets létaux mais aussi le temps de métamorphose, comme cela a été effectué chez la noctuelle *S. littoralis* (Avilès et al., 2019). De plus, comme observé dans une étude réalisée sur l'espèce *D. magna*, les différents stades de développement d'une espèce exposée semblent être sensibles de manière différenciée aux expositions de phtalates (Shen et al., 2019). Les autres castes des abeilles telles que les mâles et les reines pourraient également être directement exposées aux phtalates directement afin d'avoir une vue d'ensemble sur tous les castes et stades de développement des abeilles. L'exposition des mâles permettrait d'investiguer l'impact des phtalates sur la production des spermatozoïdes. Pour

également analyser l'impact des phtalates sur la production de spermatozoïdes, une perspective serait d'exposer un mâle à l'un des différents phtalates et à différentes doses, puis de l'accoupler à une reine saine (c'est-à-dire non exposée aux phtalates). Il a été supposé par Avilès et collègues (2020) qu'en exposant un mâle à de fortes doses de DEHP et en l'accouplant avec une femelle non contaminée, les chances d'éclosion sont réduites car la production de spermatozoïdes était affectée (Avilès et al., 2020). L'expérience inverse pourrait également être réalisée (exposition d'une reine à une dose de phtalates et accouplement avec un mâle non contaminé). Cela pourrait permettre d'analyser l'impact transgénérationnel comme réalisé dans une étude sur la drosophile *D. melanogaster* (Chen et al., 2019). Cette étude a montré qu'une exposition d'un(e) mâle/femelle accouplé(e) avec le sexe sain opposé impacte différemment la masse de la progéniture (Chen et al., 2019).

Une dernière perspective serait de permettre aux bourdons d'être directement en contact avec la source de nourriture contaminée par les phtalates. Cela permettrait d'une part de savoir si les bourdons sont capables de détecter les phtalates présents dans leur source de nourriture, comme cela a été démontré chez les fourmis *L. niger* (Cuvillier et al., 2014). Cela permettrait d'autre part d'évaluer si l'impact de ces polluants est plus prononcé lorsque les abeilles doivent activement rechercher leur nourriture. Si les abeilles se nourrissent malgré tout de la source contaminée, cela permettrait d'analyser les effets physiologiques et de déterminer si la consommation des individus est impactée par cette exposition. En effet, certains phtalates tels que le DEHP pourraient impacter les voies olfactives et digestives des invertébrés (Avilès et al., 2019). L'impact de ces composés organiques volatils sur les voies digestives pourrait être plus important lorsque les individus sont exposés par voie orale (contamination de la nourriture).

5.4. Conclusions générales

Nous avons montré ici que le DnBP suit un profil de toxicité non monotone sur *B. terrestris*, impliquant ainsi que les phtalates peuvent agir comme des perturbateurs endocriniens. De plus, ce phtalate, à certaines doses environnementales trouvées en ville, induit de la mortalité en conditions d'élevage individuelles. Cela indique que ces doses peuvent impacter les bourdons isolés et déjà affaiblis au niveau de leur système immunitaire. De plus, nous avons mis en évidence qu'une dose mixte de phtalates (DnBP 600 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w) induit également de la mortalité en conditions d'élevage individuelles, bien que ces doses mélangées n'agissent pas en synergie ou en addition. Le DEHP à doses environnementales n'a quant à lui pas eu d'effets significatifs sur le taux de mortalité des ouvrières individuelles. Dans ces conditions d'élevage, le DEHP ne semble pas être toxique pour *B. terrestris*, que ce soit par exposition à court ou à long terme.

Nous avons également mis en évidence que toutes les doses environnementales de phtalates (seules ou en mélange) n'ont pas d'effets significatifs sur la survie des ouvrières. A certaines doses, le DnBP impacte ainsi le taux de survie uniquement par exposition à court terme. De même, la socialité chez les abeilles joue un rôle tampon contre certaines molécules. Toutefois, certaines de ces doses induisent des effets sublétaux sur la production des colonies. En effet, ces doses augmentent la masse des individus de certains stades larvaires tels que les larves pré défécation et les pupes. La consommation de pollen des ouvrières exposées à l'un des différents traitements ne diffère pas entre les traitements. La consommation de sirop se trouve quant à elle augmentée par une exposition au phtalate mixte (DnBP 60 ng/g b.w & DEHP 120 ng/g b.w) mais semble diminuer lorsque les individus sont exposés aux doses environnementales de DnBP et de DEHP les plus faibles.

La faune et la flore sont continuellement exposées aux phtalates présents dans tous les environnements. Il est donc important d'investiguer leurs effets sur les invertébrés terrestres et en particulier sur les abeilles sauvages, ces dernières étant en déclin et jouant un rôle important dans la pollinisation des plantes à fleurs.

Références

- Adams, W. J., Biddinger, G. R., Robillard, K. A., & Gorsuch, J. W. (1995). A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(9), 1569-1574. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140916>
- Alston, D. G., Tepedino, V. J., Bradley, B. A., Toler, T. R., Griswold, T. L., & Messinger, S. M. (2007). Effects of the Insecticide Phosmet on Solitary Bee Foraging and Nesting in Orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environmental Entomology*, 36(4), 811-816. <https://doi.org/10.1093/ee/36.4.811>
- Andreu, B. (2024). *Identification et caractérisation fonctionnelle de récepteurs olfactifs impliqués dans la détection de phéromones sociales chez l'abeille domestique Apis mellifera* [Phdthesis, Université Paris-Saclay]. <https://theses.hal.science/tel-04601831>
- Arulanandam, C. D., Hwang, J.-S., Rathinam, A. J., & Dahms, H.-U. (2022). Evaluating different web applications to assess the toxicity of plasticizers. *Scientific Reports*, 12(1), 19684. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18327-0>
- Atli, E. (2010). *The effects of dibutyl phthalate (DBP) on the development and fecundity of Drosophila melanogaster*. <http://acikerisim.nevsehir.edu.tr/xmlui/handle/20.500.11787/1847>
- Avilès, A., Boulogne, I., Durand, N., Maria, A., Cordeiro, A., Bozzolan, F., Goutte, A., Alliot, F., Dacher, M., Renault, D., Maibeche, M., & Siaussat, D. (2019). Effects of DEHP on post-embryonic development, nuclear receptor expression, metabolite and ecdysteroid concentrations of the moth *Spodoptera littoralis*. *Chemosphere*, 215, 725-738. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.102>
- Avilès, A., Cordeiro, A., Maria, A., Bozzolan, F., Boulogne, I., Dacher, M., Goutte, A., Alliot, F., Maibeche, M., Massot, M., & Siaussat, D. (2020). Effects of DEHP on the ecdysteroid pathway, sexual behavior and offspring of the moth *Spodoptera littoralis*. *Hormones and Behavior*, 125, 104808. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104808>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: A critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>
- Baldock, K. C. (2020). Opportunities and threats for pollinator conservation in global towns and cities. *Current Opinion in Insect Science*, 38, 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.01.006>
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015). "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4." *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1-48. [doi:10.18637/jss.v067.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01).
- Bauer, M. J., & Herrmann, R. (1997). Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. *Science of The Total Environment*, 208(1), 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00272-6)
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., & Moilleron, R. (2013). Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(11), 8057-8076. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1982-5>

- Bernardo, T. J., & Dubrovsky, E. B. (2012). Molecular Mechanisms of Transcription Activation by Juvenile Hormone : A Critical Role for bHLH-PAS and Nuclear Receptor Proteins. *Insects*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/insects3010324>
- Billings, A., Jones, K. C., Pereira, M. G., Spurgeon, D. J., Billings, A., Jones, K. C., Pereira, M. G., & Spurgeon, D. J. (2021). Plasticisers in the terrestrial environment : Sources, occurrence and fate. *Environmental Chemistry*, 18(3), 111-130. <https://doi.org/10.1071/EN21033>
- Blanchard, O., Glorennec, P., Mercier, F., Bonvallot, N., Chevrier, C., Ramalho, O., Mandin, C., & Bot, B. L. (2014). Semivolatile Organic Compounds in Indoor Air and Settled Dust in 30 French Dwellings. *Environmental Science & Technology*, 48(7), 3959-3969. <https://doi.org/10.1021/es405269q>
- B-Lands Consulting. (s. d.). EU REACH | Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) | B-Lands Consulting. (c)2007-2020 reachteam.eu, all rights reserved. https://reachteam.eu/web/english/legislations/EU/reach/regulation-EC-1907-2006_V_dd.mm.yyyy.html
- Bradlee, C. A., & Thomas, P. (2003). Aquatic Toxicity of Phthalate Esters. In C. A. Staples (Éd.), *Series Anthropogenic Compounds : Phtalate Esters* (p. 263-298). Springer. <https://doi.org/10.1007/b11469>
- Brady, S. G., Sipes, S., Pearson, A., & Danforth, B. N. (2006). Recent and simultaneous origins of eusociality in halictid bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1594), 1643-1649. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3496>
- Bromenshenk, J. J., Carlson, S. R., Simpson, J. C., & Thomas, J. M. (1985). Pollution monitoring of puget sound with honey bees. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4687), 632-634. <https://doi.org/10.1126/science.227.4687.632>
- Brooks ME, Kristensen K, van Benthem KJ, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, Skaug HJ, Maechler M, Bolker BM (2017). “glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling.” *The R Journal*, 9(2), 378-400. [doi:10.32614/RJ-2017-066](https://doi.org/10.32614/RJ-2017-066).
- Brown, M. J. F., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees : A global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416. <https://doi.org/10.1051/apido/2009019>
- Burdine, J. D., & McCluney, K. E. (2019). Interactive effects of urbanization and local habitat characteristics influence bee communities and flower visitation rates. *Oecologia*, 190(4), 715-723. <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04416-x>
- Burger, H., Ayasse, M., Dötterl, S., Kreissl, S., & Galizia, C. G. (2013). Perception of floral volatiles involved in host-plant finding behaviour : Comparison of a bee specialist and generalist. *Journal of Comparative Physiology A*, 199(9), 751-761. <https://doi.org/10.1007/s00359-013-0835-5>
- Campos, M., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47, 156-163. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.47.2.12>

- Canivenc-Lavier, M.-C., Boudalia, S., Folia, M., & Kouidhi, W. (2013). *Endocrine Disruptors : Sensory and Behavioral Alterations. Perturbateurs endocriniens: altérations comportementales et sensorielles.*
- Cao, H., Wiemerslage, L., Marttila, P. S. K., Williams, M. J., & Schiöth, H. B. (2016). Bis-(2-ethylhexyl) Phthalate Increases Insulin Expression and Lipid Levels in *Drosophila melanogaster*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(3), 309-316. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12587>
- Carnevali, O., Tosti, L., Speciale, C., Peng, C., Zhu, Y., & Maradonna, F. (2010). DEHP Impairs Zebrafish Reproduction by Affecting Critical Factors in Oogenesis. *PLOS ONE*, 5(4), e10201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010201>
- Casas, M., Chevrier, C., Hond, E. D., Fernandez, M. F., Pierik, F., Philippat, C., Slama, R., Toft, G., Vandentorren, S., Wilhelm, M., & Vrijheid, M. (2013). Exposure to brominated flame retardants, perfluorinated compounds, phthalates and phenols in European birth cohorts : ENRIECO evaluation, first human biomonitoring results, and recommendations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216(3), 230-242. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.05.009>
- Chen, M.-Y., Liu, H.-P., Cheng, J., Chiang, S.-Y., Liao, W.-P., & Lin, W.-Y. (2019). Transgenerational impact of DEHP on body weight of *Drosophila*. *Chemosphere*, 221, 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.193>
- Chen, W.-L., & Sung, H.-H. (2005). The toxic effect of phthalate esters on immune responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment. *Aquatic Toxicology*, 74(2), 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.008>
- Chung, Y.; Rabe-Hesketh, S.; Dorie, V.; Gelman, A.; Liu, J. A nondegenerate penalized likelihood estimator for variance parameters in multilevel models. *Psychometrika* 2013, 78, 685–709. [doi:10.1007/s11336-013-9328-2](https://doi.org/10.1007/s11336-013-9328-2)
- Commission Directive 2005/80/EC of 21 November 2005 Amending Council Directive 76/768/EEC, Concerning Cosmetic Products, for the Purposes of Adapting Annexes II and III Thereto to Technical Progress (Text with EEA Relevance), COM, 303 OJ L (2005). <http://data.europa.eu/eli/dir/2005/80/oj/eng>
- Conte, Y. L., & Hefetz, A. (2008). Primer Pheromones in Social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 53(Volume 53, 2008), 523-542. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091434>
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D. M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A. L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S. K., Simons, J. F., ... Lipkin, W. I. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318(5848), 283-287. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>
- Crall, J. D., de Bivort, B. L., Dey, B., & Ford Versypt, A. N. (2019). Social Buffering of Pesticides in Bumblebees: Agent-Based Modeling of the Effects of Colony Size and Neonicotinoid Exposure on Behavior Within Nests. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00051>

- Cuvillier-Hot, V., & Lenoir, A. (2020). Invertebrates facing environmental contamination by endocrine disruptors: Novel evidences and recent insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 504, 110712. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110712>
- Cuvillier-Hot, V., Salin, K., Devers, S., Tasiemski, A., Schaffner, P., Boulay, R., Billiard, S., & Lenoir, A. (2014). Impact of ecological doses of the most widespread phthalate on a terrestrial species, the ant *Lasius niger*. *Environmental Research*, 131, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.016>
- Danforth, B. N., Cardinal, S., Praz, C., Almeida, E. A. B., & Michez, D. (2013). The Impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 57-78. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153633>
- Dani, F. R., Jones, G. R., Corsi, S., Beard, R., Pradella, D., & Turillazzi, S. (2005). Nestmate Recognition Cues in the Honey Bee : Differential Importance of Cuticular Alkanes and Alkenes. *Chemical Senses*, 30(6), 477-489. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji040>
- Dargnat, C., Teil, M.-J., Chevreuril, M., & Blanchard, M. (2009). Phthalate removal throughout wastewater treatment plant : Case study of Marne Aval station (France). *Science of The Total Environment*, 407(4), 1235-1244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.027>
- Deguines, N., Julliard, R., Flores, M. de, & Fontaine, C. (2012). The Whereabouts of Flower Visitors : Contrasting Land-Use Preferences Revealed by a Country-Wide Survey Based on Citizen Science. *PLOS ONE*, 7(9), e45822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045822>
- Desclos le Peley, V., Grateau, S., Moreau-Vauzelle, C., Raboteau, D., Chevallereau, C., Requier, F., Aupinel, P., & Richard, F.-J. (2024). Experimental Ecotoxicology Procedures Interfere with Honey Bee Life History. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 43(6), 1320-1331. <https://doi.org/10.1002/etc.5872>
- Doorn, A., & Heringa, J. (1986). The ontogeny of a dominance hierarchy in colonies of the Bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux*, 33, 3-25. <https://doi.org/10.1007/BF02224031>
- Dormann, C., Schweiger, O., Arens, P. F. P., Augenstein, I., Aviron, S., Bailey, D., Baudry, J., Billeter, R., Bugter, R. J. F., Bukacek, R., Burel, F., Cerny, M., Cock, R. de, Blust, G. de, DeFilippi, R., Diekötter, T., Dirksen, J., Durka, W., Edwards, P. J., ... Zobel, M. (2008). Prediction uncertainty of environmental change effects on temperate European biodiversity. *Ecology Letters*, 11(3), 235-244. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01142.x>
- Dötterl, S., Milchreit, K., & Schäffler, I. (2011). Behavioural plasticity and sex differences in host finding of a specialized bee species. *Journal of Comparative Physiology A*, 197(12), 1119-1126. <https://doi.org/10.1007/s00359-011-0673-2>
- Duchateau, M. J., & Velthuis, H. H. W. (1988). Development and Reproductive Strategies in *Bombus Terrestris* Colonies. *Behaviour*, 107(3-4), 186-207. <https://doi.org/10.1163/156853988X00340>
- Easton-Calabria, A. C., Thuma, J. A., Cronin, K., Melone, G., Laskowski, M., Smith, M. A. Y., Pasadyn, C. L., de Bivort, B. L., & Crall, J. D. (2023). Colony size buffers interactions between neonicotinoid exposure and cold stress in bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 290(2003), 20230555. <https://doi.org/10.1098/rspb.2023.0555>

- ECHA (2018). Annex XVII to REACH – Conditions of restriction. Available at <https://echa.europa.eu/documents/10162/aaa92146-a005-1dc2debe-93c80b57c5ee>
- Ellis, E. C., Gauthier, N., Klein Goldewijk, K., Bliege Bird, R., Boivin, N., Díaz, S., Fuller, D. Q., Gill, J. L., Kaplan, J. O., Kingston, N., Locke, H., McMichael, C. N. H., Ranco, D., Rick, T. C., Shaw, M. R., Stephens, L., Svenning, J.-C., & Watson, J. E. M. (2021). People have shaped most of terrestrial nature for at least 12,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(17), e2023483118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023483118>
- Erkekoglu, P., Kocer-Gumusel, B., Erkekoglu, P., & Kocer-Gumusel, B. (2016). Environmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals : A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A. In *Environmental Health Risk—Hazardous Factors to Living Species*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62455>
- Feng, S., Lu, H., Tian, P., Xue, Y., Lu, J., Tang, M., & Feng, W. (2020). Analysis of microplastics in a remote region of the Tibetan Plateau : Implications for natural environmental response to human activities. *Science of The Total Environment*, 739, 140087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140087>
- Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., Coe, M. T., Daily, G. C., Gibbs, H. K., Helkowski, J. H., Holloway, T., Howard, E. A., Kucharik, C. J., Monfreda, C., Patz, J. A., Prentice, I. C., Ramankutty, N., & Snyder, P. K. (2005). Global Consequences of Land Use. *Science*, 309(5734), 570-574. <https://doi.org/10.1126/science.1111772>
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., & Leboulenger, F. (2005). Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 288-294. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.008>
- Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36(6), 1429-1438. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00367-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00367-0)
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810-821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Gao, D.-W., & Wen, Z.-D. (2016). Phthalate esters in the environment : A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment*, 541, 986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.148>
- Gaudin, R., Marsan, P., Ndaw, S., Robert, A., & Ducos, P. (2011). Biological monitoring of exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in six French factories : A field study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 84(5), 523-531. <https://doi.org/10.1007/s00420-010-0566-7>
- Gaur, K., Varshney, H., Subhan, I., Fatima, J., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2023). Evaluation of bis-(2-ethylhexyl) phthalate toxicity on the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. *Food and Chemical Toxicology*, 114425. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114425>
- Gauthier, M., Aliouane, Y., Bernadou, A., & Armengaud, C. (2008). *Effets du fipronil à des doses sublétales sur le comportement de l'abeille*.

- Gekière, A., Vanderplanck, M., & Michez, D. (2023). Trace metals with heavy consequences on bees: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 895, 165084. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165084>
- Geslin, B., Féon, V. L., Folschweiller, M., Flacher, F., Carmignac, D., Motard, E., Perret, S., & Dajoz, I. (2016). The proportion of impervious surfaces at the landscape scale structures wild bee assemblages in a densely populated region. *Ecology and Evolution*, 6(18), 6599. <https://doi.org/10.1002/ece3.2374>
- Giam, C. S., Chan, H. S., Neff, G. S., & Atlas, E. L. (1978). Phthalate Ester Plasticizers : A New Class of Marine Pollutant. *Science*, 199(4327), 419-421. <https://doi.org/10.1126/science.413194>
- Godfray, H. C. J., Blacquière, T., Field, L. M., Hails, R. S., Potts, S. G., Raine, N. E., Vanbergen, A. J., & McLean, A. R. (2015). A restatement of recent advances in the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1818), 20151821. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1821>
- Gomez Ramirez, W. C., Thomas, N. K., Muktar, I. J., & Riabinina, O. (2023). The neuroecology of olfaction in bees. *Current Opinion in Insect Science*, 56, 101018. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101018>
- Gómez-Ramos, M. M., García-Valcárcel, A. I., Tadeo, J. L., Fernández-Alba, A. R., & Hernando, M. D. (2016). Screening of environmental contaminants in honey bee wax comb using gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4609-4620. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5667-0>
- Goulson, D. (2010). *Bumblebees* (p. 415-429). Cambridge University Press. <http://dspace.stir.ac.uk/handle/1893/9129>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grün, F., & Blumberg, B. (2009). Endocrine disruptors as obesogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1), 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>
- Gruntenko, N. E., & Rauschenbach, I. Y. (2008). Interplay of JH, 20E and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *Journal of Insect Physiology*, 54(6), 902-908. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.004>
- Hansen E, Nilsson NH, Lithner D, Lassen C (2013). Hazardous substances in plastic materials. Danish Technological Insitute. Available at https://www.byggemiljo.no/wp-content/uploads/2014/10/72_ta3017.pdf [verified 5 March 2021]
- Hartig, F. (2021) DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models.
- He, Y., Lin, W., Shi, C., Li, R., Mu, C., Wang, C., & Ye, Y. (2022). Accumulation, detoxification, and toxicity of dibutyl phthalate in the swimming crab. *Chemosphere*, 289, 133183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133183>
- Heindler, F. M., Alajmi, F., Huerlimann, R., Zeng, C., Newman, S. J., Vamvounis, G., & van Herwerden, L. (2017). Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di(2-ethylhexyl)phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.029>

- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates : Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>
- Higuchi, T. T., Palmer, J. S., Gray, L. E., Jr., & Veeramachaneni, D. N. R. (2003). Effects of Dibutyl Phthalate in Male Rabbits following in Utero, Adolescent, or Postpubertal Exposure. *Toxicological Sciences*, 72(2), 301-313. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg036>
- Horn, O., Nalli, S., Cooper, D., & Nicell, J. (2004). Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research*, 38(17), 3693-3698. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.012>
- Humann-Guillemot, S., Fuentes, A., Maria, A., Couzi, P., & Siaussat, D. (2024). *Cadmium and Phthalate Impacts Developmental Growth and Mortality of Spodoptera Littoralis, But Not Reproductive Success* (SSRN Scholarly Paper 4713454). <https://doi.org/10.2139/ssrn.4713454>
- IHS Markit (2015), Chemical Economics Handbook -- Plasticizers, <https://www.ihsmarkit.com/products/plasticizers-chemical-economics-handbook.html> (accessed on 18 July 2017).
- Ings, T., Raine, N., & Chittka, L. (2005). Mating preference in the commercially imported bumblebee species *Bombus terrestris* in Britain (Hymenoptera : Apidae). *Entomologia Generalis*, 28, 233-238.
- Jensen, J., van Langevelde, J., Pritzl, G., & Krogh, P. H. (2001). Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate and dibutyl phthalate on the collembolan *Folsomia fimetaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(5), 1085-1091. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200520>
- Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. *Annual Review of Entomology*, 58(Volume 58, 2013), 181-204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., & Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*, 103(6), 582-587. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103582>
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P., & Sumpter, J. P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), 194-202. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015<0194:IOTGIR>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015<0194:IOTGIR>2.3.CO;2)
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., & Fabian, S. (2021). Package 'survminer'-drawing survival curves using 'ggplot2'. R Cran.
- Kennedy, C. M., Oakleaf, J. R., Theobald, D. M., Baruch-Mordo, S., & Kiesecker, J. (2019). Managing the middle: A shift in conservation priorities based on the global human modification gradient. *Global Change Biology*, 25(3), 811-826. <https://doi.org/10.1111/gcb.14549>
- Kim, E.-J., Kim, J.-W., & Lee, S.-K. (2002). Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environment International*, 28(5), 359-365. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00058-2)
- Kleijn, D. & Raemakers, I. (2008) A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumblebee species. *Ecology*, 89, 1811-1823.

- Knowles C.O ; Michael J. McKee; Donald U. Palawski (1987). *Chronic effects of DI-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of Daphnia magna*, 6(3), 201–208. doi:10.1002/etc.5620060305
- Krunić, M. D., Terzić, L. R., & Kulinčević, J. M. (1989). Honey resistance to air contamination with arsenic from a copper processing plant. *Apidologie*, 20(3), 251-255. <https://doi.org/10.1051/apido:19890307>
- Laborie, S., Moreau-Guigon, E., Alliot, F., Desportes, A., Oziol, L., & Chevreuil, M. (2016). A new analytical protocol for the determination of 62 endocrine-disrupting compounds in indoor air. *Talanta*, 147, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.028>
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., & Rousselle, C. (2015). Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: A qualitative method of assessment. *Environmental Health*, 14(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13>
- Lambin, E. F., & Meyfroidt, P. (2011). Global land use change, economic globalization, and the looming land scarcity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3465-3472. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100480108>
- Larsson, P. (1983). Transport of 14C-labelled PCB compounds from sediment to water and from water to air in laboratory model systems. *Water Research*, 17(10), 1317-1326. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(83\)90258-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90258-0)
- Law, J. H., & Wells, M. A. (1989). Insects as biochemical models. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16335-16338. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84707-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84707-5)
- Lenoir, A., Boulay, R., Dejean, A., Touchard, A., & Cuvillier-Hot, V. (2016). Phthalate pollution in an Amazonian rainforest. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(16), 16865-16872. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7141-z>
- Lenoir, A., Cuvillier-Hot, V., Devers, S., Christidès, J.-P., & Montigny, F. (2012). Ant cuticles : A trap for atmospheric phthalate contaminants. *Science of The Total Environment*, 441, 209-212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.003>
- Lenth, R. (2018) lsmeans: Least-Squares Means.
- Lerman, S. B., Contosta, A. R., Milam, J., & Bang, C. (2018). To mow or to mow less : Lawn mowing frequency affects bee abundance and diversity in suburban yards. *Biological Conservation*, 221, 160-174. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.025>
- Lindauer, M. (1976). The social behavior of the bees : A comparative study. *Insectes Sociaux*, 23(2), 199-200. <https://doi.org/10.1007/BF02223852>
- Liu, H., Cui, K., Zeng, F., Chen, L., Cheng, Y., Li, H., Li, S., Zhou, X., Zhu, F., Ouyang, G., Luan, T., & Zeng, Z. (2014). Occurrence and distribution of phthalate esters in riverine sediments from the Pearl River Delta region, South China. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.038>
- Lowell Center (2011), Phthalates and Their Alternatives: Health and Environmental Concerns, Lowell Center for Sustainable Production, Lowell, <https://www.sustainableproduction.org/downloads/PhthalateAlternatives-January2011.pdf>.

- Luo, Q., Liu, Z., Yin, H., Dang, Z., Wu, P., Zhu, N., Lin, Z., & Liu, Y. (2018). Migration and potential risk of trace phthalates in bottled water : A global situation. *Water Research*, 147, 362-372. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.002>
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., & Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 217(1), 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>
- Mathieu-Denoncourt, J., Wallace, S. J., de Solla, S. R., & Langlois, V. S. (2016). Influence of Lipophilicity on the Toxicity of Bisphenol A and Phthalates to Aquatic Organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(1), 4-10. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1812-9>
- Matias, D. M., S, Leventon, J., Rau, A., Borgemeister, C., & von Wehrden, H. (2017). *A review of ecosystem service benefits from wild bees across social contexts*. 46(4), 456-467. <https://doi.org/10.1007/s13280-016-0844-z>
- Meeker, J. D., Sathyanarayana, S., & Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics : Human exposure and associated health outcomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2097-2113. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0268>
- Meyer, D., Dimitriadou, E., Hornik, K., Weingessel, A., Leisch, F., Chih-Chung Chang, Chih-Chen Lin. (2023). *e1071 : Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien (1.7-14)*. <https://cran.r-project.org/web/packages/e1071/index.html>
- Michael, P. R., Adams, W. J., Werner, A. F., & Hicks, O. (1984). Surveillance of phthalate esters in surface waters and sediments in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(3), 377-389. <https://doi.org/10.1002/etc.5620030303>
- Michener, C. D. (1969). Comparative Social Behavior of Bees. *Annual Review of Entomology*, 14(Volume 14, 1969), 299-342. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.001503>
- Michener, C. D. (1974). *The Social Behavior of the Bees : A Comparative Study*. Harvard University Press.
- Michener, C. D. (2000). *The Bees of the World*. JHU Press.
- Michener, C. D. (2007). *The Bees of the World, 2 Edn*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Michez, D. (2019). *Abeilles d'Europe—Hyménoptères d'Europe vol.1*. <https://www.napeditons.com/fr/50-abeilles-d-europe-hymenopteres-d-europe-vol1-.html>
- Michez, D., Patiny, S., Rasmont, P., Timmermann, K., & Vereecken, N. J. (2008). Phylogeny and host-plant evolution in Melittidae *s.l.* (Hymenoptera : Apoidea). *Apidologie*, 39(1), 146-162. <https://doi.org/10.1051/apido:2007048>
- Michez, D., Rasmont, P., & Terzo, M. (2019). *Abeilles d'Europe : Hyménoptères d'Europe • 1 (French Edition)*. NAP.
- Michez, D., Vanderplanck, M. & Engel, M. S. (2011). Fossil bees and their plant associates. Evolution of Plant-Pollinator Relationships, 103-164. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139014113.006>

- Migliarini, B., Piccinetti, C. C., Martella, A., Maradonna, F., Gioacchini, G., & Carnevali, O. (2011). Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. *General and Comparative Endocrinology*, 170(3), 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.025>
- Mokkapati, J. S., Bednarska, A. J., & Laskowski, R. (2022). Physiological and biochemical response of the solitary bee *Osmia bicornis* exposed to three insecticide-based agrochemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113095. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113095>
- Morandin, L. A., Winston, M. L., Franklin, M. T., & Abbott, V. A. (2005). Lethal and sub-lethal effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). *Pest Management Science*, 61(7), 619-626. <https://doi.org/10.1002/ps.1058>
- Moreau-Guigon, E., Alliot, F., Gaspéri, J., Blanchard, M., Teil, M.-J., Mandin, C., & Chevreuril, M. (2016). Seasonal fate and gas/particle partitioning of semi-volatile organic compounds in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*, 147, 423-433. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.10.006>
- Nasir, M., Ata-ul-Mohsan, Saeed, S., Ahmad, M., & Aziz, M. A. (2019). *Effect of Different Diapause Conditions on Bombus terrestris Colony Characteristics*. 51(4), 1273.
- Net, S., Delmont, A., Sempéré, R., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Science of The Total Environment*, 515-516, 162-180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.013>
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, Fate, Behavior and Ecotoxicological State of Phthalates in Different Environmental Matrices. *Environmental Science & Technology*, 49(7), 4019-4035. <https://doi.org/10.1021/es505233b>
- Nijhout HF. 1994. *Insect Hormones*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. 267 pp.
- OCDE, Holland, M. (Éd.). (2018). *Socio-economic assessment of phthalates*. [https://one.oecd.org/document/ENV/WKP\(2018\)7/En/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/WKP(2018)7/En/pdf)
- OCDE. (2017, octobre 8). *Essai no. 246: Bourdon, essai de toxicité aiguë par contact*. OCDE. https://www.oecd.org/fr/publications/2017/10/test-no-246-bumblebee-acute-contact-toxicity-test_g1g8379c.html
- OECD (2017). Report of the International Ring Test for the Standardisation of an Acute Oral and Contact Test on Bumblebees in the Laboratory in 2015. Series on Testing and Assessment No.269, ENV Publications. OECD, Paris.
- Oehlmann, J., Oetken, M., & Schulte-Oehlmann, U. (2008). A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research*, 108(2), 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.016>
- Ollerton, J. (2017). Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 353-376. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022919>
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>

- Owen, E. L., Bale, J. S., & Hayward, S. A. L. (2013). Can Winter-Active Bumblebees Survive the Cold? Assessing the Cold Tolerance of *Bombus terrestris audax* and the Effects of Pollen Feeding. *PLOS ONE*, 8(11), e80061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080061>
- Peijnenburg, W. J. G. M. (2008). Phthalates. In S. E. Jørgensen & B. D. Fath (Éds.), *Encyclopedia of Ecology* (p. 2733-2738). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00419-5>
- Petrović, M., Eljarrat, E., López de Alda, M. J., & Barceló, D. (2001). Analysis and environmental levels of endocrine-disrupting compounds in freshwater sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(11), 637-648. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00118-2](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00118-2)
- Planelló, R., Herrero, O., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2011). Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquatic Toxicology*, 105(1), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.011>
- Plutino, M., Bianchetto, E., Durazzo, A., Lucarini, M., Lucini, L., & Negri, I. (2022). Rethinking the Connections between Ecosystem Services, Pollinators, Pollution, and Health : Focus on Air Pollution and Its Impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/ijerph19052997>
- Pomeroy, N., & Plowright, R. C. (1979). Larval ejection following CO2 narcosis of bumble bees (Hymenoptera:Apidae).https://www.researchgate.net/publication/285484161_Larval_ejection_following_CO2_narcosis_of_bumble_bees_Hymenoptera_Apidae
- Porto, R. G., de Almeida, R. F., Cruz-Neto, O., Tabarelli, M., Viana, B. F., Peres, C. A., & Lopes, A. V. (2020). Pollination ecosystem services : A comprehensive review of economic values, research funding and policy actions. *Food Security*, 12(6), 1425-1442. <https://doi.org/10.1007/s12571-020-01043-w>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines : Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Pradhan, A., Olsson, P.-E., & Jass, J. (2018). Di(2-ethylhexyl) phthalate and diethyl phthalate disrupt lipid metabolism, reduce fecundity and shortens lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 190, 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.123>
- Ran, D., Cai, S., Wu, H., & Gu, H. (2012). Le phtalate de Di (2-éthylhexyle) module la transmission cholinergique mini-présynaptique des neurones de projection dans le lobe antennaire de *la drosophile*. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3291-3297. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.070>
- Rehwagen, M., Müller, A., Massolo, L., Herbarth, O., & Ronco, A. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of The Total Environment*, 348(1), 199-210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.050>
- Richards, K. W. (1977). OVARIAN DEVELOPMENT OF QUEEN AND WORKER BUMBLE BEES (HYMENOPTERA : APIDAE) IN SOUTHERN ALBERTA. *The Canadian Entomologist*, 109(1), 109-116. <https://doi.org/10.4039/Ent109109-1>

- Ricketts, T. H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Bogdanski, A., Gemmill-Herren, B., Greenleaf, S. S., Klein, A. M., Mayfield, M. M., Morandin, L. A., Ochieng', A., & Viana, B. F. (2008). Landscape effects on crop pollination services : Are there general patterns? *Ecology Letters*, 11(5), 499-515. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01157.x>
- Ropars, L., Dajoz, I., Fontaine, C., Muratet, A., & Geslin, B. (2019). Wild pollinator activity negatively related to honey bee colony densities in urban context. *PLOS ONE*, 14(9), e0222316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222316>
- Rosales, C. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. *Insect Physiology and Ecology*. <https://doi.org/10.5772/67107>
- Röseler, P.-F., Röseler, I., & van Honk, C. G. J. (1981). Evidence for inhibition of corpora allata activity in workers of *Bombus terrestris* by a pheromone from the queen's mandibular glands. *Experientia*, 37(4), 348-351. <https://doi.org/10.1007/BF01959856>
- Röseler, Peter-Frank (1970). Unterschiede in der Kastendetermination zwischen den Hummelarten *Bombus hypnorum* und *Bombus terrestris* / Differences in the Caste Determination between the Bumblebee Species *Bombus hypnorum* and *Bombus terrestris*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 25(5), -. doi:10.1515/znb-1970-0521
- Rottler, A.-M., Schulz, S., & Ayasse, M. (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>
- Rudel, R. A., & Perovich, L. J. (2009). Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment*, 43(1), 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.025>
- Saillefaite, A.-M., & Laudet-Hesbert, A. (2005). Phthalates. *EMC - Toxicologie-Pathologie*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.emctp.2004.10.003>
- Sanchez-Prado, L., Llompарт, M., Lamas, J. P., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2011). Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes. *Talanta*, 85(1), 370-379. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.03.079>
- Schiestl, F. P., & Johnson, S. D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(5), 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.01.019>
- Seto, K. C., Güneralp, B., & Hutyra, L. R. (2012). Global forecasts of urban expansion to 2030 and direct impacts on biodiversity and carbon pools. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16083-16088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211658109>
- Seyoum, A., & Pradhan, A. (2019). Effect of phthalates on development, reproduction, fat metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 654, 969-977. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.158>
- Sharma, H. K., Devi, D., Thakur, M., Rana, K., & Prashad, H. (2021). "Bumble bees" invitro rearing methods - a review. *International Journal Of Tropical Insect Science*, 42(2), 1045-1057. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00675-5>

- Shen, C., Wei, J., Wang, T., & Wang, Y. (2019). Acute toxicity and responses of antioxidant systems to dibutyl phthalate in neonate and adult *Daphnia magna*. *PeerJ*, 7, e6584. <https://doi.org/10.7717/peerj.6584>
- Shen, G.-M., Chen, Z.-W., & Wang, Y.-L. (2022). Distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in leaf cuticular waxes and leaf tissues of plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(2), 18. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03351-w>
- Sıralı, R., Uğur, A., & Kocamanoğlu, Ç. (2012). The possibilities of using bumble bees in greenhouses. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 16-20.
- Smith, R. M., Gaston, K. J., Warren, P. H., & Thompson, K. (2006). Urban domestic gardens (VIII) : Environmental correlates of invertebrate abundance. *Biodiversity & Conservation*, 15(8), 2515-2545. <https://doi.org/10.1007/s10531-005-2784-y>
- Soto, A., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M., Olea, N., & Serrano, F. O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens : An update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl 7), 113-122. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s7113>
- Staples A. Charles; William J. Adams; Thomas F. Parkerton; Joseph W. Gorsuch; Gregory R. Biddinger; Kevin H. Reinert (1997). Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. 16(5), 875–891. doi : [10.1002/etc.5620160507](https://doi.org/10.1002/etc.5620160507)
- Staples, C. A., Peterson, D. R., Parkerton, T. F., & Adams, W. J. (1997). The environmental fate of phthalate esters : A literature review. *Chemosphere*, 35(4), 667-749. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00195-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00195-1)
- Stout, J. C., & Morales, C. L. (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40(3), 388-409. <https://doi.org/10.1051/apido/2009023>
- Sung, H.-H., Kao, W.-Y., & Su, Y.-J. (2003). Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology*, 64(1), 25-37. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00011-0)
- Team, R. C., Team, M. R. C., Suggests, M. A. S. S., & Matrix, S. (2018). Package “Stats.”. The R Stats Package.
- Teil, M. J., Blanchard, M., & Chevreuril, M. (2006). Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Science of The Total Environment*, 354(2), 212-223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.083>
- Terzo, C. (2023). *Impact des phtalates sur le développement de micro-colonies de Bombus terrestris L.*
- Therneau, T. (2024). *A Package for Survival Analysis in R*. R package version 3.7-0, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
- Thimmegowda, G. G., Mullen, S., Sottolare, K., Sharma, A., Mohanta, S. S., Brockmann, A., Dhandapany, P. S., & Olsson, S. B. (2020). A field-based quantitative analysis of sublethal effects of air pollution on pollinators. *Proceedings of the National Academy of Science*, 117, 20653-20661. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009074117>

- Torné-Noguera, A., Rodrigo, A., Osorio, S., & Bosch, J. (2016). Collateral effects of beekeeping : Impacts on pollen-nectar resources and wild bee communities. *Basic and Applied Ecology*, 17(3), 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2015.11.004>
- Tylianakis, J. M., Didham, R. K., Bascompte, J., & Wardle, D. A. (2008). Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11(12), 1351-1363. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01250.x>
- Uren-Webster, T. M., Lewis, C., Filby, A. L., Paull, G. C., & Santos, E. M. (2010). Mechanisms of toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 99(3), 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.015>
- Van Honk, C. G. J., Velthuis, H. H. W., Röseler, P.-F., & Malotaux, M. E. (1980). The Mandibular Glands of *Bombus Terrestris* Queens as a Source of Queen Pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 28(2), 191-198. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1980.tb03004.x>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals : Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathélet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? *PLOS ONE*, 9(1), e86209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086209>
- Velthuis, H. H. W. (2002). *THE HISTORICAL BACKGROUND OF THE DOMESTICATION OF THE BUMBLE-BEE, BOMBUS TERRESTRIS, AND ITS INTRODUCTION IN AGRICULTURE*.
- Velthuis, H. H. W., & Doorn, A. van. (2006). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, 37(4), 421-451. <https://doi.org/10.1051/apido:2006019>
- Wagner, D. L., Grames, E. M., Forister, M. L., Berenbaum, M. R., & Stopak, D. (2021). Insect decline in the Anthropocene : Death by a thousand cuts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(2), e2023989118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023989118>
- Wastian, L., Unterweger, P., & Betz, O. (2016). Influence of the reduction of urban lawn mowing on wild bee diversity (Hymenoptera, Apoidea). *Journal of Hymenoptera Research*, 49, 51-63. <https://doi.org/10.3897/JHR.49.7929>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed. 2016). Springer International Publishing : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Lohmann, R., Caba, A., & Ruck, W. (2007). Occurrence and Air-Sea Exchange of Phthalates in the Arctic. *Environmental Science & Technology*, 41(13), 4555-4560. <https://doi.org/10.1021/es0630240>
- Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A., & Ruck, W. (2006). Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, 565(2), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.02.027>
- Xing, H., Yu, X., Huang, J., Du, X., Wang, M., Sun, J., Lu, G., & Tao, X. (2022). Characteristics and Health Risks of Phthalate Ester Contamination in Soil and Plants in Coastal Areas of South China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijerph19159516>

- Xu, L., Li, L., Yang, P., & Ma, Z. (2017). Calmodulin as a downstream gene of octopamine-OAR α 1 signalling mediates olfactory attraction in gregarious locusts. *Insect Molecular Biology*, 26(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/imb.12266>
- Zattara, E. E., & Aizen, M. A. (2021). Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth*, 4(1), 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>
- Zhang, Q., Hao, L.-C., & Hong, Y. (2020). Exposure evaluation of diisononyl phthalate in the adults of *Drosophila melanogaster* : Potential risks in fertility, lifespan, behavior, and modes of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 238, 108847. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108847>
- Zhang, Q., Ma, W., & Zhu, J. (2023). *Combined Toxicities of Di-Butyl Phthalate and Polyethylene Terephthalate to Zebrafish Embryos*. 11(5), 469. <https://doi.org/10.3390/toxics11050469>
- ZHAO, W-h., LI, S-g., ZHANG, X-w. Antagonism of vitc and vite on lipid peroxidation in drosophila melanogaster treated with dehp [j]. *J. Tongji Univ. (Med. Sci.)*, 3 (2003), p. 000. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20083197617>
- Zhu, Q., Xu, L., Wang, W., Liu, W., Liao, C., & Jiang, G. (2022). Occurrence, spatial distribution and ecological risk assessment of phthalate esters in water, soil and sediment from Yangtze River Delta, China. *Science of The Total Environment*, 806, 150966. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150966>

Annexes

7.1. Annexe 1 : expériences préliminaires

7.1.1. Expérience par application topique au diméthoate

Avant l'exposition par application topique aux divers traitements contrôles ou phtalates sur *Bombus terrestris*, un test préliminaire est réalisé avec une substance de référence afin de démontrer la sensibilité des bourdons et afin de voir si l'exposition aiguë par contact est bien réalisée (OCDE, 2017). Le produit chimique utilisé est le diméthoate de la marque PESTANAL® (CAS : 60-51-5). 10 µg de cette matière active par bourdon permettrait d'obtenir une mortalité supérieure ou égale à 50 % à la fin de la période d'essai (OCDE, 2017). Le diméthoate se trouve sous forme de poudre, une dilution dans de l'eau distillée est nécessaire pour réaliser l'exposition. Deux microlitres de traitement final sera déposé sur le thorax du bourdon et contiendra 10 µg de diméthoate. Une solution traitement de 200 µl est préparée : 1000 µg de diméthoate dans 200 µl d'eau distillée.

7.1.1.1. Matériels et méthodes

L'installation et le maintien des ouvrières dans les cages individuelles sont réalisés comme expliqué au point 3.3.1.1. Installation et maintien du matériels et méthodes. L'exposition est réalisée de la même manière qu'au point 3.3.1.2. Exposition topicale aiguë (matériels et méthodes). Seul le nombre de bourdons exposés et les traitements changent : 30 ouvrières sont exposées à l'eau distillée (contrôle) et 30 sont exposées au diméthoate.

L'effet des traitements sur la mortalité des ouvrières a été évalué à l'aide d'un GLMM binomiale et une fonction de lien logit (fonction « glmmTBM », package « glmmTMB » ; Brooks et al., 2017).

7.1.1.2. Résultats et discussion

L'exposition topicale aiguë au diméthoate 10 000 ng/g b.w a un effet significatif sur la mortalité par rapport à l'eau (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 21,401$, $df = 1$, $p\text{-value} < 0,0001$; Figure 22). Ces résultats nous indiquent que les ouvrières sont sensibles à l'exposition aiguë par contact et que cette manipulation est bien réalisée.

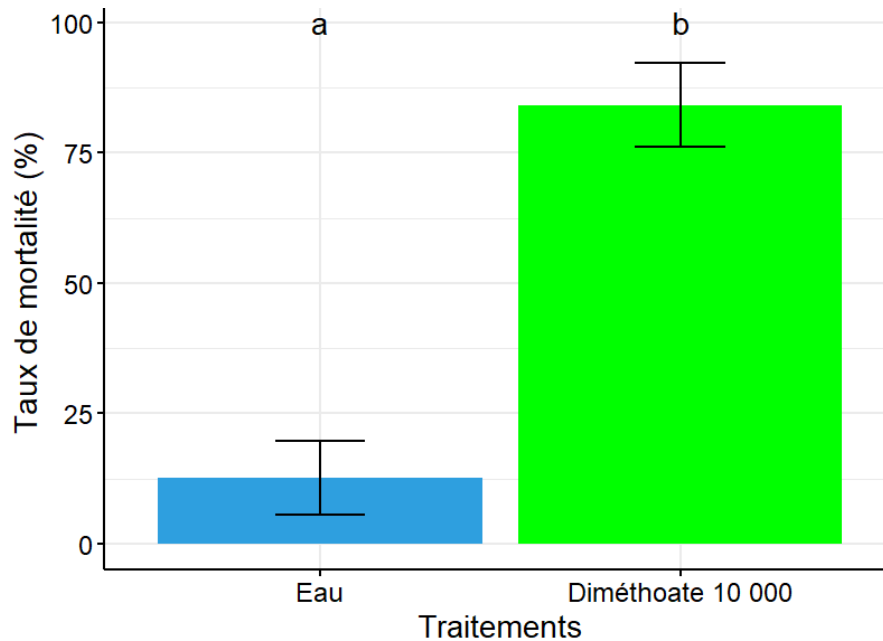


Figure 22 : Taux de mortalité (%) des ouvrières en fonction des traitements. Nombre totale d'ouvrières exposées à un des traitements = 60. La concentration de diméthoate est exprimée en ng/g b.w. Les différentes lettres indiquent une différence significative (p -value < 0,05) entre les traitements (GLMM, famille binomiale). Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard).

7.1.2. Exposition par application topique à l'acétone pur

7.1.2.1. Matériels et méthodes

Avant de pouvoir exposer les bourdons à l'acétone pur, un test préliminaire est réalisé afin de voir si ce solvant était toxique pour eux. L'installation et le maintien des ouvrières dans les cages individuelles est réalisée comme expliqué au point 3.3.1.1. Installation et maintien (matériels et méthodes). Seul le nombre d'ouvrières installées change : 42 individus installés. Installer 42 ouvrières dans les cages individuelles permet d'avoir quelques individus supplémentaires afin d'en exposer suffisamment en cas de mortalité due aux conditions de maintien de l'élevage.

L'exposition est réalisée de la même qu'expliquer au point 3.3.1.2. Exposition topicale aiguë (matériels et méthodes). Seul le nombre d'ouvrières exposées et les traitements changent : 30 ouvrières sont exposées à un des trois traitements préparés dans des Eppendorf : acétone pur, acétone 10% dilué dans de l'eau minérale SPA ou eau minérale SPA.

Les effets des traitements sur la mortalité des ouvrières ont été évalués à l'aide de l'inférence Bayésienne sur l'effet fixe (traitement) en utilisant un a priori par défaut (fonction « bglmer », package « blme » ; Chung, et al., 2013), car un problème de séparation complète était présent.

7.1.2.2. Résultats et discussion

L'exposition topicale aiguë aux différents traitements n'a pas non plus eu d'effets significatifs sur la mortalité des ouvrières de *B. terrestris* (BLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 1,5077$, $df = 2$, p -value = 0,4706 ; Figure 23). Nous pouvons donc utiliser l'acétone pur pour diluer nos phtalates à haute concentration (DnBP 6 000 ng/g b.w, DEHP 12 000 ng/g b.w). De plus, certaines études utilisent ce solvant pour diluer leur substance et ensuite l'appliquer par voie orale ou par contact sur les abeilles (Gauthier et al., 2008).

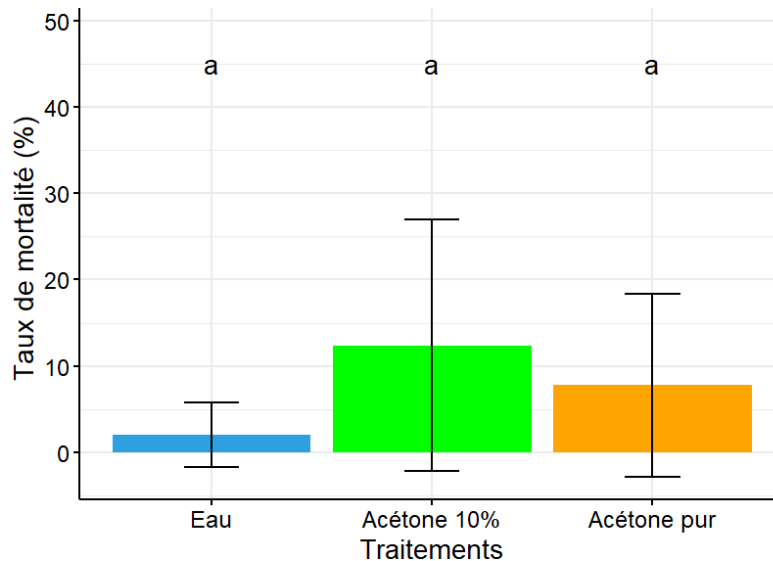


Figure 23 : Taux de mortalité (%) des ouvrières en fonction des traitements (ng/g b.w). Nombre totale d'ouvrières exposées à un des traitements = 60. Les différentes lettres indiquent une différence significative (p -value < 0,05) entre les traitements (GLMM, famille binomiale). Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard).

7.2. Annexe 2 : protocole des expositions d'ouvrières de *B. terrestris* au DnBP et DEHP effectuées en 2022 au Laboratoire EEP UMR 8198, Lille

7.2.1. Préparation des traitements

Le DnBP (n° CAS 117-81-7) et le DEHP (n° CAS 84-74-2) ont été achetés à Sigma-Aldrich sous forme de solution liquide. La première dilution de ces phtalates a été faite dans du méthanol pour permettre une bonne solubilité, puis les étapes de dilution suivantes ont été faites dans de l'eau minérale en bouteilles en verre (SPA Reine, SPA NV, Bruxelles, Belgique) pour assurer la plus faible concentration de méthanol dans les solutions finales (0,07%). L'exposition à une solution témoin contenant 0,07 % de méthanol ainsi qu'à une solution témoin ne contenant que de l'eau minérale ont été utilisées pour évaluer la toxicité du solvant. Du matériel en verre (décontaminé

à l'hexane et à l'acétone et, aussi souvent que possible, par calcination) a été utilisé pour préparer toutes les solutions. Les ouvrières ont été exposées à 60 ng/g b.w. de DnBP ou 120 ng/g b.w. de DEHP comme doses de base (c.-à-d. 1X) et ont été encadrés par des traitements 0,1X (DnBP 6 ng/g b.w. ou DEHP 12 ng/g b.w.) et 10X (DnBP 600 ng/g b.w. ou DEHP 1 200 ng/g b.w.).

7.2.2. Design expérimental

Le protocole d'exposition utilisé a été adapté de la ligne directrice n°246 établie par l'OCDE pour l'évaluation de la toxicité des composés chimiques via l'exposition aiguë de *Bombus terrestris* (OCDE, 2017). Les expositions ont été effectuées en trois sessions (Tableau 9). Lors de chaque session, dans chacun des quatre groupes de traitements, i.e. DnBP (pour une des trois doses testées), DEHP (pour une des trois doses testées), les contrôles Eau minérale ou Méthanol 0.07%, 12 ouvrières de chacune des trois colonies mères pourvues d'une reine, achetées chez Biobest NV (Waterloo, Belgium) ont été installées. Ensuite, 10 ouvrières de chacune des colonies mères ont été exposée à l'un des quatre traitements (Tableau 9). Les colonies mères ont été renouvelées à chaque session. Avant l'exposition, les ouvrières ont été installées dans des cages métalliques artisanales de dimensions similaires aux Nicot Cages®. Ces cages ont été décontaminées à l'hexane et à l'acétone au préalable afin de limiter la présence de phtalates sur les surfaces en contact avec les ouvrières. Pendant toute la durée de l'expérience, les ouvrières ont eu accès *ad libitum* à du sirop à 65% (masse/masse) à l'aide d'une pipette pasteur en verre décontaminée également à l'hexane et l'acétone. Une période d'acclimatation de 8 heures a également été respectée avant d'anesthésier les ouvrières par refroidissement. Lors de l'anesthésie, elles ont été placées dans un congélateur à -20°C jusqu'à évanouissement (ou max. 10 minutes). Les ouvrières ont ensuite été exposées à la solution de phtalate ou de contrôle correspondant en déposant une gouttelette de 2µL à l'aide d'un micro-capillaire en verre calcinée de 10 µL sur la partie glabre du thorax. Après l'exposition, les ouvrières ont été maintenues à température ambiante, à la lumière du jour et avec accès *ad libitum* au sirop 65% pendant les 72 heures restantes de l'expérience. La mortalité a été comptabilisée après 16 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures. À chaque observation, les ouvrières mortes ont été pesées. En fin de période d'observation, tous les individus survivants ont été pesés et sacrifiés.

Au terme de l'expérience d'exposition, les ouvrières ont également été flashées à l'azote liquide et conservées à -80°C. Le taux de corps gras, l'expression de gènes impliqués dans l'olfaction et dans la voie des ecdystéroïdes ainsi que des paramètres d'activité antibactérienne de l'hémolymphe sont aussi des paramètres qui seront ultérieurement mesurés.

Tableau 9 : Nombre d'ouvrières exposées par session, par traitement et pour chaque colonie mère.

Session	Groupes (Molécules et doses utilisées durant la session)	Nombre d'ouvrières exposées (Colonie : nb.)
Session 1	DnBP 60 (DnBP 60 ng/g b.w)	30 (A: 10; B: 10, C: 10)
	DEHP 12 (DEHP 12 ng/g b.w)	30 (A: 10; B: 10, C: 10)
	Contrôle eau (Eau minérale SPA)	30 (A: 10; B: 10, C: 10)
	Contrôle solvant (Méthanol 0.07%)	30 (A: 10; B: 10, C: 10)
Session 2	DnBP 6 (DnBP 6 ng/g b.w)	30 (D: 10; E: 10, F: 10)
	DEHP 120 (DEHP 120 ng/g b.w)	30 (D: 10; E: 10, F: 10)
	Contrôle eau (Eau minérale SPA)	30 (D: 10; E: 10, F: 10)
	Contrôle solvant (Méthanol 0.07%)	30 (D: 10; E: 10, F: 10)
Session 3	DnBP 600 (DnBP 600 ng/g b.w)	30 (G: 10; H: 10, I: 10)
	DEHP 1200 (DEHP 1200 ng/g b.w)	30 (G: 10; H: 10, I: 10)
	Contrôle eau (Eau minérale SPA)	30 (G: 10; H: 10, I: 10)
	Contrôle solvant (Méthanol 0.07%)	30 (G: 10; H: 10, I: 10)

7.3. Annexe 3 : courbe de survie en microcolonie après 72 heures

La première ouvrière est morte 72 heures après la première exposition (Figure 24). Cette ouvrière provient d'une microcolonie du contrôle rien. Les autres traitements n'ont pas provoqué de mortalité. Après la réalisation d'une régression de Cox, aucune différence significative n'est détectée entre les traitements ou contrôles (Régression de Cox, p -value = 0,7778).

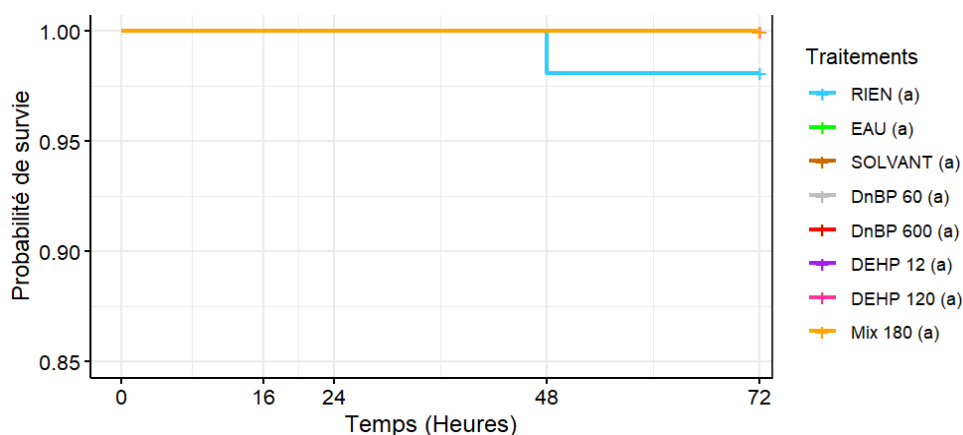


Figure 24 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières de *B. terrestris* exposées aux traitements DnBP à doses environnementales (ng/g b.w) et au contrôle. Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (N par traitement = 5). Chaque étape correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment de l'exposition de toutes les ouvrières et le taux de mortalité est observé jusqu'à 72 heures. Les lettres identiques à côté des traitements indiquent une différence non significative entre les conditions à p -value > 0,05. Notez que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.85 – 1.00).

7.4. Annexe 4 : résultats des effets des phtalates sur la mortalité en conditions isolées

Ces résultats regroupent uniquement ceux générés durant ce mémoire. Sur les 674 ouvrières de *Bombus terrestris* exposées, 624 ont survécu à l'exposition d'un des traitements et 50 sont mortes. Les ouvrières placées traitées au DEHP 1200 ng/g de bourdon sont celles ayant eu le plus de mortalité (25% de mortalité). 5% des ouvrières exposées au DEHP 12 ng/g b.w, au DnBP 6000 ng/g b.w ou au mélange de DnBP 60 ng/g b.w et DEHP 120 ng/g b.w sont mortes, représentant les traitements (hormis les contrôles) ayant eu le taux de mortalité le plus bas (Tableau 10).

Tableau 10 : Nombre d'ouvrières vivantes ou mortes exposées par traitement. Le pourcentage de mortalité a été calculé comme suit : (ouvrières mortes / (ouvrières mortes + ouvrières vivantes)) *100. Les traitements DEHP et DnBP sont exprimés en ng/g b.w.

Traitements	Contrôle	DEHP 12	DEHP 120	DEHP 1200	DEHP 12000	DnBP 6	DnBP 60	DnBP 600	DnBP 6000	DnBP 60 & DEHP 120	DnBP 600 & DEHP 120
Vivants	414	19	18	15	17	18	51	18	19	19	16
Morts	21	1	2	5	3	2	8	2	1	1	4
Pourcentage de mortalité	5	5	10	25	15	10	14	10	5	5	20

7.4.1. Effet du DnBP sur la mortalité individuelle

L'exposition topicale aiguë aux différents traitements de DnBP n'a pas d'effets significatifs sur la mortalité des ouvrières, quelle que soit la dose de DnBP utilisée (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 7,9826$, $df = 4$, p -value = 0,09222 ; Figure 25). Après la réalisation d'un post-hoc à comparaisons multiples par paires à l'aide de la correction de Benjamini-Hochberg, une augmentation non significative de la mortalité pour le traitement DnBP 60 ng/g b.w par rapport au contrôle est observée (post-hoc, p -value = 0,0523). La courbe de Kaplan-Meier montre une diminution du taux de survie des ouvrières au DnBP 600 ng/g b.w dès les premières 24 heures après exposition et diminue ensuite 96 heures après exposition (Figure 26). Le DnBP 60 ng/g b.w semble être le traitement ayant un taux de survie d'ouvrières le plus faible ($\pm 86\%$), avec une augmentation du taux de mortalité à partir de 48 heures après exposition. Cependant, la régression de Cox montre un effet non significatif des traitements sur la mortalité des ouvrières (Régression de Cox, p -value = 0,0972), ainsi qu'une augmentation non significative de la mortalité pour le traitement DnBP 60 ng/g b.w par rapport au contrôle (post-hoc, p -value = 0,0523), confirmant les résultats obtenus avec le modèle GLMM binomial.

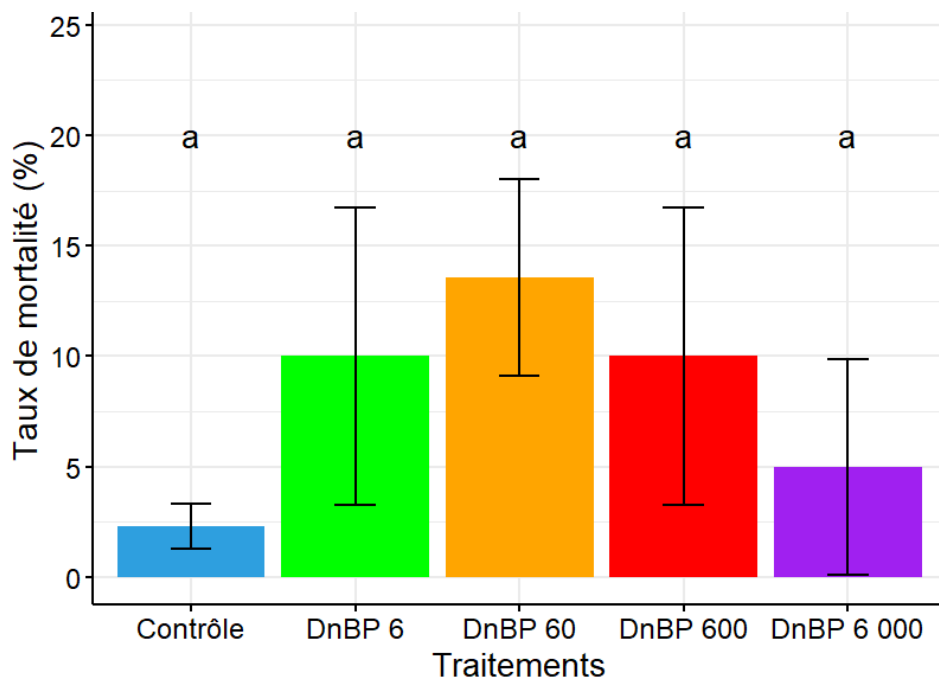


Figure 25 : Taux de mortalité (%) des ouvrières en fonction des traitements DnBP à doses environnementales (ng/g b.w) et du contrôle 96 heures après l'exposition. Nombre totale d'ouvrières exposées à un des traitements = 338. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (p -value < 0,05). Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard ; GLMM, famille binomiale). Aucune différence significative du traitement sur la mortalité n'est observée (p -value > 0,05).

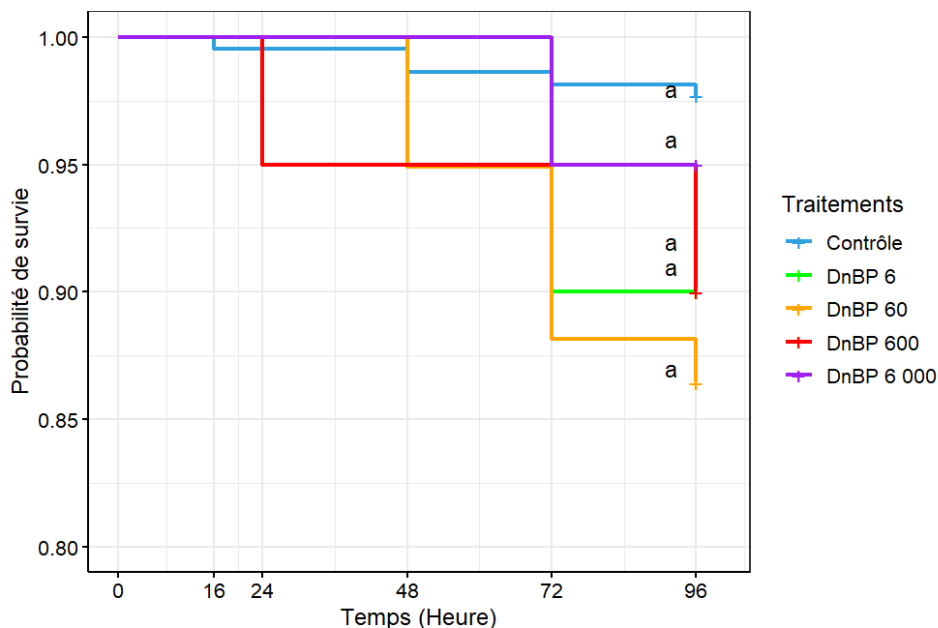


Figure 26 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières de *B. terrestris* exposées aux traitements DnBP à doses environnementales (ng/g b.w) et au contrôle. Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (nombre total d'ouvrières exposées à un des traitements = 338). Chaque étape correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment de l'exposition de toutes les ouvrières et le taux de mortalité est observé jusqu'à 96 heures. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (p -value < 0,05). Notons que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.70 – 1.00). Aucune différence significative du traitement sur la mortalité n'est observée (p -value > 0,05).

7.4.2. Effet du DEHP sur la mortalité individuelle

L'exposition topicale aiguë aux différents traitements de DEHP n'a pas non plus eu d'effets significatifs sur la mortalité des ouvrières de *B. terrestris*, quel que soit la dose de DEHP utilisée (GLMM, famille binomiale, $\chi^2 = 6,4212$, $df = 4$, p -value = 0,1698 ; Figure 27). La courbe de Kaplan-Meier indique le DEHP 12 ng/g bw est le traitement ayant un taux de survie des ouvrières le plus élevé (95% ; Figure 28). L'exposition des ouvrières au DEHP 1 200 ng/g b.w a réduit la survie des ouvrières de 25 %, avec un premier taux de survie ayant chuté 24 heures et 72 heures après l'exposition. Cependant, la régression de Cox montre un effet non significatif des traitements sur la mortalité des ouvrières (Régression de Cox, p -value = 0.2272) ;

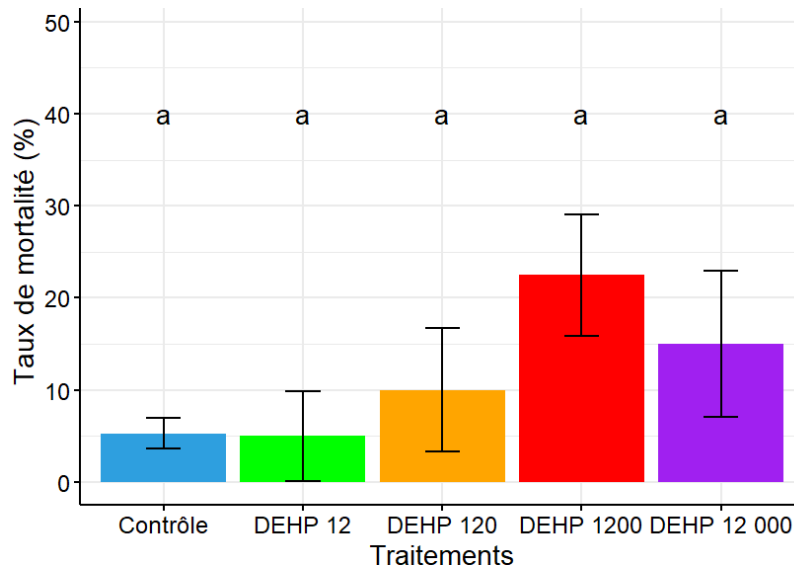


Figure 27 : Pourcentage de mortalité des ouvrières en fonction des traitements DEHP à doses environnementales (ng/g b.w) et du contrôle 96 heures après l'exposition. Nombre totale d'ouvrières exposées à un des traitements = 236. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (p -value < 0,05). Les barres d'erreur montrent l'erreur standard pour la moyenne, calculée avec la fonction « emmeans » (taux de mortalité \pm erreur standard ; GLMM, famille binomiale). Aucune différence significative du traitement sur la mortalité n'est observée (p -value > 0,05).

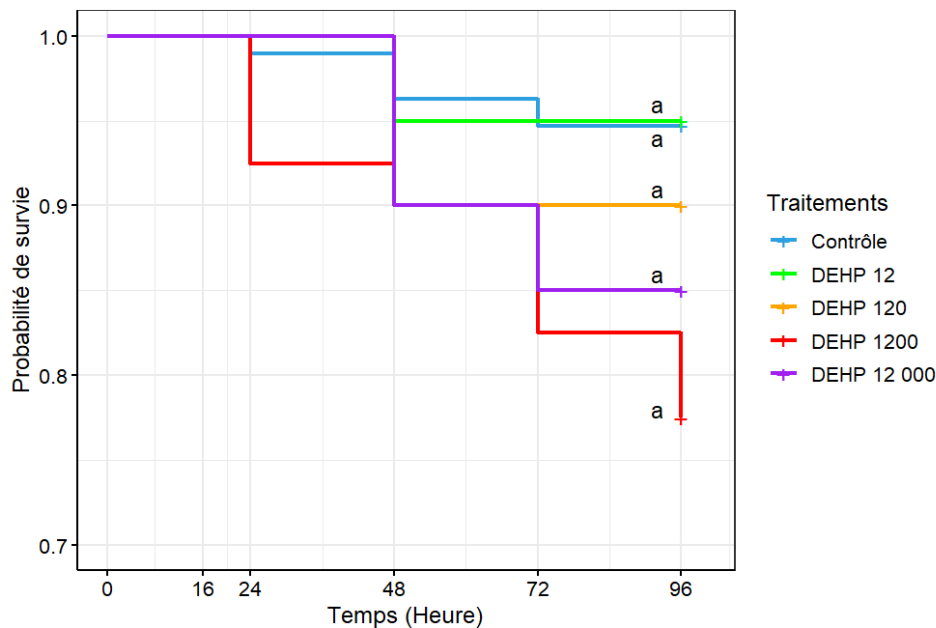


Figure 28 : Courbe de survie de Kaplan-Meier des ouvrières exposées aux traitements DEHP à doses environnementales (ng/g b.w) et au contrôle. Les données représentent les probabilités de survie des ouvrières en fonction des traitements (nombre total d'ouvrières exposées à un des traitements = 236). Chaque étape correspond à une vérification du taux de mortalité. Le temps 0 correspond au moment où toutes les ouvrières sont exposées. Le taux de mortalité est observé jusqu'à 96 heures après exposition. Les différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (p -value < 0,05). Notons que l'axe de proportion de survie a été modifié (0.70 - 1.00). Aucune différence significative du traitement sur la mortalité n'est observée (p -value > 0,05).