



**HAL**  
open science

# Étude comparative de la réactivité des cellules du système immunitaire (invertébrés et vertébrés) vis-à-vis des pesticides

Louise Walderdorff

► **To cite this version:**

Louise Walderdorff. Étude comparative de la réactivité des cellules du système immunitaire (invertébrés et vertébrés) vis-à-vis des pesticides. Ecotoxicologie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0268 . tel-02558402

**HAL Id: tel-02558402**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02558402v1>**

Submitted on 29 Apr 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

## THÈSE

Pour l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

Mention : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Soutenue publiquement par :

**Louise WALDERDORFF**

le 24 Septembre 2019

**Étude comparative de la réactivité des cellules du système  
immunitaire (invertébrés et vertébrés)  
vis-à-vis des pesticides**

### Membres du jury

**TARNUS Céline**, Université de Haute Alsace

**Rapporteur**

**BERTSCH Christophe**, Université de Haute Alsace

**Rapporteur**

**ACHARD Sophie**, Université Paris Descartes

**Membre de jury**

**FALLA-ANGEL Jaïro**, Université de Lorraine

**Directeur de thèse**

**LAVAL-GILLY Philippe**, Université de Lorraine

**Co-directeur de thèse**



## THÈSE

Pour l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

Mention : Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes

Soutenue publiquement par :

**Louise WALDERDORFF**

le 24 Septembre 2019

**Étude comparative de la réactivité des cellules du système  
immunitaire (invertébrés et vertébrés)  
vis-à-vis des pesticides**

### Membres du jury

**TARNUS Céline**, Université de Haute Alsace

**Rapporteur**

**BERTSCH Christophe**, Université de Haute Alsace

**Rapporteur**

**ACHARD Sophie**, Université Paris Descartes

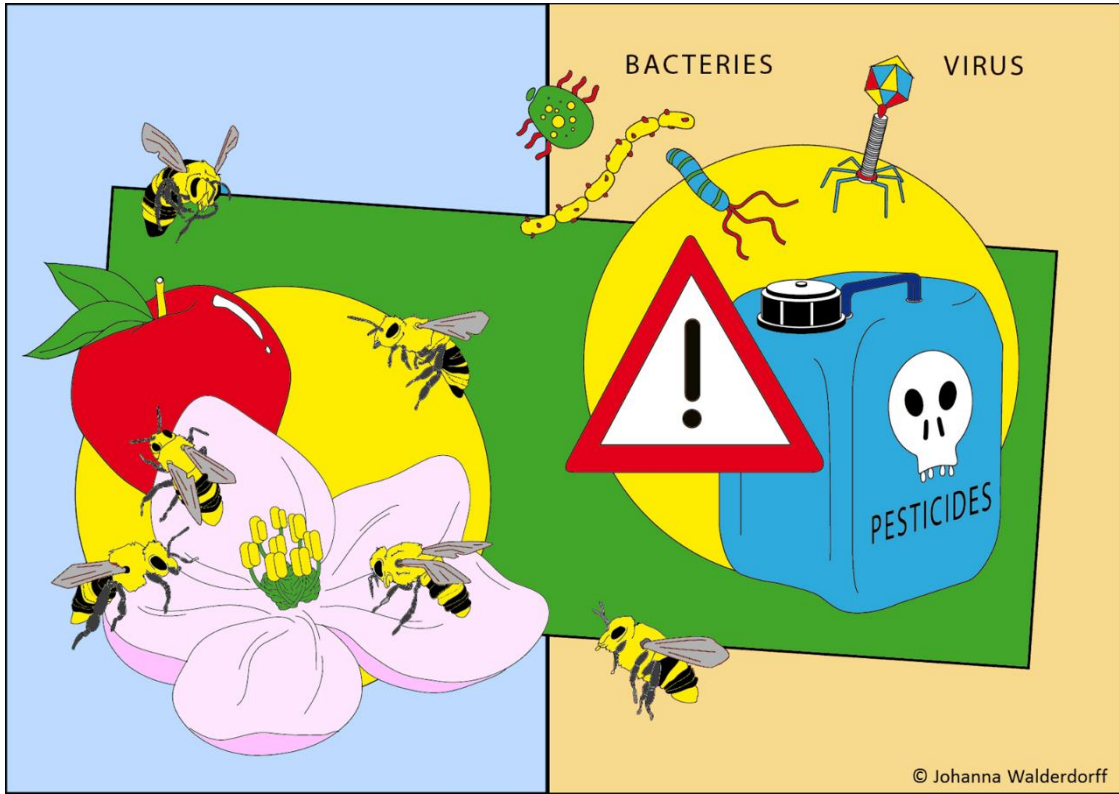
**Membre de jury**

**FALLA-ANGEL Jaïro**, Université de Lorraine

**Directeur de thèse**

**LAVAL-GILLY Philippe**, Université de Lorraine

**Co-directeur de thèse**



Thanks to Johanna Walderdorff for this illustration for the competition “ma thèse en 180s”.

## Remerciements

Premièrement, je souhaiterais remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, **Jaïro Falla**, et mon co-directeur de thèse, **Philippe Laval-Gilly** pour leur accompagnement tout au long de ce travail. Merci pour votre aide et vos précieux conseils que vous avez su m'apporter pendant ces trois années.

Je tiens à remercier tous les membres du jury, Mme **Céline Tarnus**, M. **Christophe Bertsch**, Mme **Sophie Achard** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

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

Un très, très grand merci à **Pascal Calastretti**, **Bernard Bestel**, **Paul Schweizer** et tous les apiculteurs qui m'ont donné des larves d'abeilles et pour leurs conseils apicoles (et tous les bons pots de miel !). Merci aussi à **Vincent Tillement** pour avoir accueilli mes ruches de bourdons dans ses serres.

Sans vous cette thèse n'aurait pas été possible dans ces dimensions.

Je tiens à remercier **Mélanie Mazziotti**, **Nicolas Abar** et **Laura Wechtler**, mes collègues et amis thésards pour tous les rires et bons moments que nous avons passé à l'IUT. Merci pour vos conseils, votre aide et vos idées tout au long de ma thèse. Bon courage pour vos projets du futur et bonne continuation à Laura !

Merci à **Antoine Bonnefoy** pour m'avoir appris toutes les techniques importantes de la culture cellulaire et d'avoir répondu à toutes mes questions. Merci également à **Sonia Henry** pour son aide avec la qPCR.

I thank **Pedro Negri** for his help with NO analyses.

Merci à tous mes stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pendant ma thèse : **Pierre-Marie**, **Jean-Baptiste** et **Shrunkhi**, ainsi que tous les stagiaires qui étaient installés dans notre bureau :

**Amandine, Amélie, Maureen, Jimmy, Mamadou, Estelle, Christophe, Noemie** (Merci aux trois derniers pour vos magnifiques dessins d'abeilles sur ma voiture jaune) et **Chems**.

Merci également à **Elise, Quentin, Gabin** et **Victor** pour toute leur aide avec mes statistiques. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous.

Merci à tous l'équipe de **Timbtrack** pour m'avoir accueilli si gentiment dans votre bureau pour rédiger ma thèse !

Dans mes remerciements, je ne peux pas oublier **Baudouin**. Sans lui je ne serais jamais venue en France et encore moins en Lorraine. Je te souhaite le meilleur pour tes nouveaux projets en Bretagne !

Un merci aussi à tous mes amis « messins » : en commençant par **Raphaël**, mon premier ami à Metz, **Grégoire, Florian, Jibs, Alban, Clémence, FX, Marion, Sébastien, PE** et **Adrien**. Sans vous la vie à Metz aurait été beaucoup moins chaleureuse. Merci pour tous ces BBQs, les bières en terrasse, le tennis, le squash, le padel, le basket, les tours de vélo, les courses à pied (spécialement en combinant avec du beaujolais), le ski, plein de matchs de foot (même avec la participation de l'Autriche ;-)), les spectacles, les festivals et surtout les bonnes soirées ! Un merci plus particulièrement à Florian, qui m'a aidée à ramener plein de cadres bien remplis de larves d'abeilles depuis la Meuse. Merci également à tous les amis Autrichiens du Luxembourg, **Lisa, Lizzy, Costanza**, et tous les autres qui ont rendu la Lorraine/le Luxembourg un peu moins loin de l'Autriche.

Thanks to all my friends who have made the long journey to visit me in France not once but several times, **Julie, Sophie (Graf), Marie, Cathi, Nono, Jakob, Catherine, Stivi, Titan, Manu, Amir, Georg, Thomas**.

Un grand merci à **Ophélie** pour tous ces bons weekends chez toi en Belgique. Si quelqu'un comprend ma passion pour l'environnement c'est toi. C'est bien grâce à toi que j'ai une boîte de vers de terre dans ma cuisine et des poules dans mon jardin aujourd'hui ! Tu es une personne inspirante. Continue comme ça ! Merci également à **Geoff** pour toutes les belles balades dans les forêts belges qui m'ont permis d'échapper à la ville ! Bon courage avec Timbtrack !



Un énorme merci à **Jeanne, Mayeul, Simon** (et aussi **Christelle**) et **Clément** pour votre amitié fidèle depuis mon arrivée en France. Vous m'avez accueillie à bras ouverts dès notre première rencontre (même si je ne parlais pas bien français à l'époque). Je vous remercie pour tous ces bons moments, on pourrait presque dire « en famille », que ce soit en Belgique, en Lorraine, à St. Jorioz, à Paris, à Dijon ou dans l'Allier. Votre porte était toujours ouverte pour moi !

**Marie** thank you for your devoted friendship that even hundreds of kilometers cannot destroy. I do not know how many hours we spent on the phone, but it was like you were here with me in Metz.

And last but not least, a big thank you to my family, especially **my parents**, without whom I would not have come so far. Thank you for believing in me and supporting me. You are a role model and an inspiration to me. **Julie** for all your visits to Metz and all the weekends in Zurich or in the Suisse mountains. For your big heart, your understanding, your support and your generosity towards the poor French PhD student ;-). **Sophie and Max** for accompanying me to Metz and helping me move in my first apartment (on the 5<sup>th</sup> floor, even though you were 8 months pregnant at the time!). Thanks to Camillo for enchanting my landlord! I am pretty sure I only got the apartment thanks to him. Thanks for all the nice weekends I spent with you in Frankfurt. To **my brother** and all **my nieces** for all their patience and interest in my work. I hope you enjoyed all the bee videos I sent you.

Un tout dernier merci à mes quatre « poules princesses », Cocotte, Choucroute, Gabi et Maurice, qui ont donné un deuxième sens à la courte vie de toutes les pauvres larves d'abeilles et bourdons, qui ont dû laisser leur vie pour la science. J'espère que vous avez bien aimé votre dessert.



# COMMUNICATIONS

## Publications :

- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2018. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (*lipopolysaccharide*) of *Escherichia coli*. *Journal of Insect Physiology*, 108, p. 17–24.
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Wechtler, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2019. Phagocytic Activity of Human Macrophages and *Drosophila* Hemocytes after Exposure to the Neonicotinoid Imidacloprid, *Pesticide biochemistry and physiology*, 2019, vol. 160, p. 95-101.
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Wechtler, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J. Comparison of Imidacloprid as an active ingredient and in its commercial formulation, Confidort vert, on cytokine release in human THP-1 monocytes and macrophages, manuscript soumis au journal *Toxicology and Applied Pharmacology*

## Présentations orales :

- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2018. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (*lipopolysaccharide*) of *Escherichia coli*, 10th MGPR International Symposium of Pesticides in Food and the Environment, 11.-14. Septembre 2018, Bologne, Italie
- Walderdorff L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2019. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (*lipopolysaccharide*) of *Escherichia coli*, ISTA, 25.-30. Août 2019, Thessalonique, Grèce

## Présentations par poster :

- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Henry, S., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2017, Altération de la phagocytose par les hémocytes d'insectes et les macrophages humains après exposition a un insecticide, Colloque 2017 SEFA, 29-30 juin 2017, Lille, France
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2018, L'imidaclopride intensifie son impact sur la phagocytose des hémocytes d'abeille et de bourdon lors d'une activation immunitaire par des LPS (*lipopolysaccharides*) d'*Escherichia Coli*, Séminaire RP2E, Février 2018, Nancy, France
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (*lipopolysaccharide*) of *Escherichia coli*, ISTA, 25.-30. Aout 2019, Thessalonique, Grèce
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Wechtler, L., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2019. Phagocytic Activity of Human Macrophages and *Drosophila* Hemocytes after Exposure to the Neonicotinoid Imidacloprid, ISTA, 25.-30. Août 2019, Thessalonique, Grèce



# Table des Matières

REMERCIEMENTS .....	
COMMUNICATIONS .....	
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	I
LISTE DES FIGURES .....	III
LISTE DES TABLEAUX .....	VIII
LISTE DES ANNEXES .....	VIII
<b>1. INTRODUCTION GENERALE: .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ETAT DE L'ART.....</b>	<b>7</b>
2.1. PESTICIDES .....	9
2.1.1. Néonicotinoïdes .....	12
2.1.2. Produit commercial vs. Molécule active .....	15
2.1.3. Effondrement des colonies d'abeilles.....	17
2.1.4. Déficiences immunitaires chez d'autres invertébrés et vertébrés.....	20
2.2. SYSTEME IMMUNITAIRE .....	23
2.2.1. Détection des pathogènes .....	24
2.2.2. Système immunitaire inné .....	25
2.2.2.1. Branche cellulaire du système immunitaire .....	25
2.2.2.2. Phagocytose .....	27
2.2.2.3. Branche humorale du système immunitaire inné .....	28
2.2.2.4. Voies de signalisation .....	29
2.2.2.4.1. Voie Toll et TLR .....	30
2.2.2.4.2. Voie JAK/STAT.....	31
2.2.2.4.3. Voie Imd et TNFR .....	33
2.2.2.5. Espèces réactives de l'oxygène .....	35
2.2.2.6. Cytokines .....	37
2.3. OBJECTIF .....	41
<b>3. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>43</b>
3.1. DEMARCHE SCIENTIFIQUE.....	45
3.2. CULTURE CELLULAIRE.....	47
3.2.1. Monocytes/macrophages humains : lignée cellulaire THP- 1 .....	47
3.2.2. Hémocytes de drosophile : lignée cellulaire Schneider 2.....	49
3.2.3. Hémocytes d'abeilles et de bourdons .....	50
3.3. EXPOSITION CELLULAIRE .....	52

3.3.1.	<i>Exposition à l'imidaclopride et son produit commercial</i> .....	52
3.3.2.	<i>Différentiation des THP-1 en macrophages</i> .....	53
3.3.3.	<i>Activation immunitaire par les LPS</i> .....	53
3.4.	REACTIVITE CELLULAIRE .....	54
3.4.1.	<i>Viabilité cellulaire</i> .....	54
3.4.2.	<i>Phagocytose</i> .....	55
3.4.3.	<i>Détection de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire</i> .....	57
3.4.4.	<i>Détection du NO</i> .....	57
3.4.5.	<i>Cytokines</i> .....	58
3.4.6.	<i>Extraction d'ARN</i> .....	58
3.4.7.	<i>Synthèse de l'ADNc</i> .....	59
3.4.8.	<i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	60
3.4.9.	<i>qPCR</i> .....	60
3.5.	STATISTIQUES .....	62
<b>4.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>65</b>
4.1.	VIABILITE CELLULAIRE .....	65
4.1.1.	<i>Hémocytes d'abeilles (Apis mellifera)</i> .....	65
4.1.2.	<i>Hémocytes de bourdons (Bombus terrestris)</i> .....	66
4.1.3.	<i>Cellules humains THP- 1</i> .....	67
4.1.4.	<i>Schneider 2 (Drosophila melanogaster)</i> .....	68
4.1.5.	<i>Comparaison de la viabilité des cellules immunitaires chez les quatre espèces</i> .....	69
4.2.	PHAGOCYTOSE .....	71
4.2.1.	<i>Hémocytes d'abeilles (Apis mellifera)</i> .....	71
4.2.2.	<i>Hémocytes de bourdons (Bombus terrestris)</i> .....	73
4.2.3.	<i>Cellules humaines : THP-1</i> .....	77
4.2.4.	<i>Schneider 2 (Drosophila melanogaster)</i> .....	78
4.2.5.	<i>Comparaison de la phagocytose chez les quatre espèces</i> .....	81
4.3.	PRODUCTION DES ROS ET NOS APRES L'EXPOSITION A L'IMI .....	86
4.3.1.	<i>Hémocytes d'abeilles (Apis mellifera)</i> .....	86
4.3.1.2.	<i>NO</i> .....	88
4.3.2.	<i>Hémocytes de bourdons (Bombus terrestris)</i> .....	90
4.3.3.	<i>THP-1</i> .....	93
4.3.4.	<i>Comparaison de la production cellulaire de ROS et NOS chez les différentes espèces</i> .....	96
4.4.	PROTEINES PARTICIPANT A LA REPONSE IMMUNITAIRE .....	99
4.4.1.	<i>Hémocytes d'abeilles (Apis mellifera)</i> .....	99
4.4.1.1.	<i>Voie JNK : basket</i> .....	99
4.4.1.2.	<i>Voie JAK/STAT : TEP-A</i> .....	101

4.4.1.3.	Voie Imd : Relish .....	103
4.4.1.4.	Voie Toll: Spätzle, myD88 et défensine .....	104
4.4.2.	<i>Hémocytes de bourdons (Bombus terrestris)</i> .....	107
4.4.2.1.	Voie JAK/STAT : TEP-A .....	107
4.4.2.2.	Voie Imd : relish.....	108
4.4.2.3.	Voie Toll : défensine .....	109
4.4.3.	<i>Cytokines humaines</i> .....	111
4.4.3.1.	GM-CSF .....	111
4.4.3.2.	IL-6.....	113
4.4.3.3.	TNF-alpha .....	116
4.4.4.	<i>Comparaison de l'impact de l'IMI sur les différentes voies de signalisation chez trois espèces différentes</i> .....	118
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>ANNEXES</b> .....	<b>142</b>





# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique	EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	ELISA : Enzyme-linked immune sorbent assay
AMP : Antimicrobial peptide	EPA : Environmental Protection Agency
ANOVA : Analysis of variance	FADD : Fas-Associated protein with Death Domain
ARLA : L'Agence canadienne de Réglementation de la lutte Antiparasitaire	FBS : Fetal Bovine Serum
BSA : Bovine serum albumin	GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
CCD : Colony collapse disorder	HPLC : high performance liquid chromatography
CE : Concentration avec effet	INRA : Institut national de la recherche agronomique
CETAM : Centre d'Études Techniques Apicoles de Moselle	IFN : interférons
CL : Concentration létale	IKK : IκB kinase
CNRS : Centre National de la Recherche scientifique	IL- 6 : Interleukin 6
CON : Confidor vert	Imd : Immunodéficiencie
CSF : Colony stimulating factors	IMI : Imidaclopride
Ct : cycle threshold	iNOS : inducible nitric oxidide synthase
DAF-FM-DA : Diaminofluorescein-FM diacetate	IRAK : Interleukin-1 receptor-associated kinase
DAMPs : Damage-associated molecular patterns	IUT : Institut universitaire de technologie
DE : Dose avec effet	JAK/STAT : Janus kinase/ transducteur du signal et activateur de transcription
DL : Dose létale	JNK : c-Jun N-terminal kinase
DMSO : Dimethyl Sulfoxide	LPS : Lipopolysaccharide

MAMPs : microbe-associated molecular pattern

Myd88 : Myeloid differentiation primary response 88

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nAChR : Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

NEMO : NF- $\kappa$ B essential modulator

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO : nitrogen oxide

NOS : Nitrogen oxide synthases

NY : New York

PAMPs : Pathogen-associated molecular pattern

PBS : Phosphate Buffer Saline

PC : Carbonate de propylène

PGRP : protéines de reconnaissance des peptidoglycanes

PMA : Phorbol 12, myristate 13-acetate

POP : Polluants organiques persistants

PRRs : Pattern recognition receptors

PtdCho : Phosphatidylcholine

PtdS : Phosphatidylsérine

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

ROS : Reactive oxygen species

SE : Standard error

SOD : Superoxide dismutase

TEP-A : Translocation-enhancing protein A

TLR : Toll like receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor necrosis factor alpha

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TRADD : TNFR type 1-associated death domain

Upd : Unpaired

USA : United States of America

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Tendances de l'utilisation des pesticides aux États-Unis de 1964 à 2001 en millions de livres de matière active (d'après Goldman, 2007). .....	10
Figure 2: structure chimique de 6 insecticides néonicotinoïdes (d'après Casida 2010).....	13
Figure 3 : les pertes de colonies d'abeilles (CCD) signalées dans le monde (Neumann & Carreck, 2010) .....	17
Figure 4 : Formation du phagosome pendant la phagocytose (1). TLR2 ou 4 et son domaine intracellulaire TIR interagissent avec myD88 (2) provoquant la maturation du phagosome tardif et sa fusion avec le lysosome (3). L'interaction TIR/myD88 active également le complexe p38-MAPK (4) qui à son tour active l'inhibiteur de dissociation guanine-nucléotide (GDI) (5). Sa forme phosphorylée P-GDI (6) a une plus grande affinité avec la protéine Rab-5. Le complexe GDI-Rab-5 se fixe sur le phagosome précoce (7) et provoque le trafic vésiculaire du phagosome dans le cytoplasme (Clos, 2012). .....	28
Figure 5 : Signalisation de la voie de Toll pour les orthologues drosophiles et vertébrés (entre parenthèses). Les correspondances de gènes d'abeille sont montrées ci-dessous. Les gènes soulignés ont montré une régulation accrue de la transcription après un défi immunitaire (Evans et al. 2006).....	31
Figure 6 : La voie de JAK/STAT chez la drosophile, montrant des orthologues vertébrés entre parenthèses et des gènes d'abeilles mellifères en dessous (selon Evans et al. 2006)...	32
Figure 7 : Voie de signalisation Imd de la drosophile et de la TNFR humaine. Les composants conservés sont indiqués par des formes et des couleurs similaires. Bend, bendless; eff, effete; Key, Kenny; K63 Ub, K63 polyubiquitination; NEMO, NF-kB essential modulator; TAB, TAK1-binding protein; TRADD, TNFR1-associated death domain (Myllymäki et al., 2014).....	34
Figure 8: Complexe enzymatique produisant des molécules microbicides dans les macrophages. Les enzymes sont indiquées en vert ; les cases rouges indiquent les espèces qui sont toxiques pour les microbes (Beutler et al., 2004).....	36
Figure 9 : Signalisation Spätzle dans la voie Toll de la drosophile. SPE (Spätzle processing enzyme) expose la région C-terminale active sur Spaetzle, qui est couverte par le	

domaine pro. La SPE n'agit qu'en présence d'agents pathogènes. Le Spätzle, maintenant actif, se lie alors aux récepteurs de Toll (après Valanne et al., 2011). .....	39
Figure 10 : Schéma du projet. L'exposition des cellules humaines, drosophiles, abeilles et bourdons à l'imidaclopride, son produit commercial (CONFIDOR vert) et l'exposition simultanée aux pesticides et aux LPS, utilisés comme agent pathogène. ....	45
Figure 11 : Exposition des cellules aux différentes concentrations de pesticides. ....	46
Figure 12 : THP-1 d'un humain âgé d'un an atteint de leucémie monocytaire aiguë dans un hémocytomètre de Malassez, longueur mesurée par le logiciel d'imagerie NIS-Elements BR 3.10. ....	48
Figure 13 : Schneider 2 de <i>Drosophila melanogaster</i> dans un hémocytomètre de Malassez. Longueur mesurée avec le logiciel d'imagerie NIS-Elements BR 3.10. ....	50
Figure 14: À l'intérieur d'une ruche de bourdons (A) avec des cocons de nymphes (flèches blanches) et des ouvrières qui s'occupent des larves (flèches noires). B) cadre avec différents stades de développement des larves d'abeilles. C) Larves et nymphes de bourdons à différents stades de développement. ....	51
Figure 15 : coloration typique au bleu trypan de cellules Schneider (A) et de THP-1 (B et C) après traitement à l'imidaclopride. Les cellules viables sont marquées avec des flèches blanches et les cellules mortes, avec une coloration bleue, avec des flèches noires. ....	55
Figure 16 : Phagocytose des hémocytes d'abeilles. Les flèches noires représentent les cellules phagocytaires et les flèches blanches, les cellules qui ne phagocytent aucune bille de latex fluorescente. ....	56
Figure 17 : Viabilité cellulaire de l'abeille après 24 heures d'exposition au Confidor vert. La viabilité est exprimée en pourcentage de chaque groupe de traitement par rapport au groupe témoin négatif sans exposition au Confidor vert. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe témoin et toutes les concentrations testées de Confidor vert au cours des différents groupes de traitement par LPS 0, 1 et 10 µg/mL (voir ANNEXE 3 pour les tests statistiques). ....	66
Figure 18 : Viabilité des hémocytes de bourdons après exposition à l'IMI et activation immunitaire avec 10 µg/mL LPS. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives (tests statistiques ANNEXE 3). ....	67

Figure 19: Viabilité cellulaire des THP-1 après 24 heures d'exposition au Confidor vert et 0 ; 0,1 et 1 µg/mL de LPS. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les différents groupes. ....	68
Figure 20 : Phagocytose d'hémocytes d'abeilles après 5 heure d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b et c). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS. ....	72
Figure 21 : Phagocytose des hémocytes de bourdons après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement aux LPS (Voir ANNEXE 4 pour les tests statistiques).....	74
Figure 22: Phagocytose des hémocytes de bourdons de la fin de l'automne après exposition au Confidor vert. a) montre les pourcentages de cellules qui ont été capables de phagocyter au moins une bille de latex, tandis que b) montre les pourcentages de cellules qui ont phagocytés plus de 20 billes de latex. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans aucun groupe des traitements de LPS (pour des détails statistiques, voir l'ANNEXE 4).....	76
Figure 23 : Phagocytose des cellules humaines THP-1 après (a) 5 heures et après (b) 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. ..	78
Figure 24 : Phagocytose des cellules Schneider 2 de la drosophile après (a) 5 heures et après (b) 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. ....	80
Figure 25: Phagocytose des hémocytes de drosophile après 24 heures d'exposition à l'IMI et activation immunitaire simultanée avec le LPS. Les différentes lettres montrent des différences significatives entre les groupes IMI d'un même traitement PS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. Voir l'ANNEXE 4 pour les analyses statistiques.....	80

Figure 26 : Billes en latex fluorescent phagocytées par les cellules Schneider 2 de <i>D. melanogaster</i> . Les flèches blanches montrent les cellules qui ont englouti un grand nombre de billes, les flèches grises montrent les cellules qui ont englouti un petit nombre de billes et les flèches noires montrent les cellules qui n'ont pas phagocyté de billes fluorescentes en latex. La barre d'échelle est 10 $\mu\text{m}$ .....	85
Figure 27: Production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ dans les hémocytes d'abeilles après trois heures d'exposition à l'IMI (en couleur jaune/rouge) et au Confidor vert (en couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS (voir l'ANNEXE 5 pour plus des détails sur les tests statistiques).....	87
Figure 28 : Production de NO dans les hémocytes d'abeilles après 30 minutes, 1 heure et deux heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS. (Pour plus d'informations sur les tests statistiques voir ANNEXE 6). .....	89
Figure 29 : Production de $\text{H}_2\text{O}_2$ des hémocytes de bourdon après 3 heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. Pour plus d'informations sur les tests de statistiques voir ANNEXE 5.....	91
Figure 30: L'libération de NO dans les hémocytes de bourdon après 2 heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement en LPS. (Pour plus d'informations sur les tests de statistiques voir ANNEXE 6) .....	92
Figure 31 : Production de NO dans les THP-1 après 30 minutes, 1 heure et deux heures d'exposition à l'IMI ou au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 6 pour les p-values et les modèles statistiques. ....	95

Figure 32 : L'expression relative de « basket » après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS (tests statistiques voir ANNEXE 7). .....	101
Figure 33 : L'expression relative du gène TEP-A après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques)...	102
Figure 34 : L'expression relative du gène relish après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques). .....	104
Figure 35: L'expression relative des gènes Spätzle (a,b), myD88 (c,d) et défensine (e,f) après 18 heures d'exposition à l'IMI (couleurs jaunes) et au Confidor vert (couleurs bleus). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques). .....	106
Figure 36: L'expression relative du gène TEP-A dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 8 pour les tests statistiques). .....	108
Figure 37: L'expression relative du gène relish dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 8 pour les tests statistiques). .....	109
Figure 38 : L'expression relative de gène défensine dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique (ANNEXE 8). .....	110
Figure 39 : Production de GM-CSF dans les macrophages (THP-1 différenciées) après 5 ou 24 heures d'exposition à l'IMI (a,c) et au Confidor vert (b,d) et activation immunitaire avec des LPS. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement	

significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques.....	113
Figure 40 : Production d'IL-6 après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques. Les étoiles montrent des concentrations non détectables. ....	115
Figure 41 : Production de TNF-alpha dans les THP-1 après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques. Les étoiles montrent des concentrations non détectables.....	117

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Paramètres cellulaires représentant les même voies de transcriptions .....	46
Tableau 2 : Liste des amorces des abeilles et des bourdons utilisé pour la qPCR. ....	61

## **LISTE DES ANNEXES**

Annexe 1: Tableau des concentrations DL <sub>50</sub> des différentes espèces. ....	142
Annexe 2 : Concentrations des néonicotinoids (Imidacloprid, clothianidin, thiacloprid et thiametoxam) ainsi que les métabolites d'imidacloprid (6-chloronicotinic acid, imidacloprid olefin et imidacloprid 5-hydroxy) dans le pollen, le miel et les abeilles. GB Grand Bretagne.....	142
Annexe 3 : Analyses statistiques de la viabilité cellulaire, IMI imidaclopride, CON Confidor vert, activation immunitaire avec LPS en µg/mL. ....	143



Annexe 4: Tableau des tests statistiques pour la phagocytose des cellules exposées à l'IMI ou Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL. ....	144
Annexe 5: Tableau des tests statistiques pour les analyses de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> des hémocytes d'abeille et de bourdon exposées à l'IMI et au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL).....	145
Annexe 6: Tableau des tests statistiques pour les analyses de NO des cellules exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL. ....	146
Annexe 7 : Tableau des tests statistiques pour les analyses des protéines des hémocytes d'abeilles exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.....	147
Annexe 8: Tableau des tests statistiques pour les analyses des protéines des hémocytes de bourdons exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.....	148
Annexe 9: Tableau des tests statistiques pour les analyses des cytokines de cellules THP-1 exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL, LOD Limites de détection.....	149



# **INTRODUCTION GENERALE**



## 1. INTRODUCTION GENERALE:

Les pesticides synthétiques sont de plus en plus utilisés dans la lutte antiparasitaire moderne et dans l'agriculture conventionnelle. Leurs résidus sont fréquemment trouvés dans notre environnement et dans notre alimentation (Hörtig, 1993). Le groupe des insecticides les plus couramment utilisés sont les néonicotinoïdes (Bonmatin et al., 2015) Leurs résidus ont été trouvés dans les fruits et légumes traités (Fernández-Alba et al., 2000; Ko et al., 2014; Obana et al., 2002), ainsi que dans les abeilles, leur pollen et le miel (Chauzat et al., 2009; Kasiotis et al., 2014). Au cours de la dernière décennie, les néonicotinoïdes ont fait l'objet de controverses dans la littérature, car ils ont été associés à un déclin mondial des pollinisateurs. Bien que la toxicité aiguë soit plutôt rare, la cause de ce déclin était plutôt associée à une exposition chronique aux pesticides. Ces dernières années plusieurs études ont mis en relation les néonicotinoïdes et l'affaiblissement de la réponse immunitaire des pollinisateurs en montrant, par exemple, l'affaiblissement provoqué par les néonicotinoïdes sur les pollinisateurs lorsqu'ils sont confrontés à des agents pathogènes entraînant des taux d'infection et de mortalité plus élevés (Abbo et al., 2017; Alaux et al., 2010; Fauser-Misslin et al., 2014; Pettis et al., 2012; Vidau et al., 2011). Plusieurs autres études ont démontré en particulier, que les pesticides néonicotinoïdes affectent l'immunocompétence des abeilles (Brandt et al., 2016; Christen et al., 2016; Di Prisco et al., 2013; López et al., 2017). La suppression de la réponse immunitaire aux maladies infectieuses par les néonicotinoïdes a été démontrée non seulement pour les pollinisateurs (Brandt et al., 2016; Di Prisco et al., 2013; López et al., 2017) mais aussi pour les vertébrés insectivores comme les amphibiens, oiseaux, poissons et mammifères, lorsque l'on compare les épidémies avec l'utilisation des néonicotinoïdes dans les régions et pays concernés (Mason et al., 2013). Cependant, l'effet des pesticides sur la réponse immunitaire individuelle des pollinisateurs et sur une réaction immunitaire spécifique et simultanée aux agents pathogènes n'est pas encore bien compris (Collison et al., 2016).

Par ailleurs, l'hypothèse selon laquelle l'imidaclopride et la clothianidine exercent des effets sublétaux sur les vertébrés allant d'effets cytotoxiques, génotoxiques, de l'altération de la fonction immunitaire à une croissance réduite et au succès sur la reproduction a été émise

(Gibbons et al., 2015; Goulson, 2013). Plusieurs revues scientifiques ont mentionné des maladies chroniques humaines comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou des maladies auto-immunes qui pourraient être liées à une exposition sublétales aux insecticides, herbicides et fongicides (Corsini et al., 2013; Mokarizadeh et al., 2015; Mostafalou and Abdollahi, 2013, 2017), sans toutefois mentionner les néonicotinoïdes dans leur travail. Cimino et ses collaborateurs (2016) ont cité plusieurs études sur l'exposition chronique à l'imidaclopride qui ont montré des effets nocifs sur la santé humaine, mais on en sait encore peu sur les effets immunotoxiques des néonicotinoïdes sur la santé humaine.

La plupart de ces études étaient axées sur l'impact de la molécule active de ces pesticides. Bien que les produits commerciaux ne contiennent que 40 à 70 pour cent de ces molécules actives. Ces additifs qui les complètent pourraient accroître les effets négatifs des pesticides. Les pesticides pourraient donc constituer une plus grande menace pour l'environnement dans leur composition commerciale, c'est-à-dire la formulation dans laquelle ils sont appliqués que seulement leur molécule active seule.

L'objectif de cette thèse est donc de comparer la cytotoxicité de l'imidaclopride (IMI) néonicotinoïde sur les cellules du système immunitaire de plusieurs invertébrés et vertébrés. Les réponses immunitaires innées chez les mammifères et les insectes présentent plusieurs similitudes fonctionnelles. Les cellules de ces systèmes immunitaires innés, en particulier les phagocytes, sont comparables en termes de morphologie et de réactivité à la reconnaissance des pathogènes (Browne et al., 2013). Les phagocytes jouent un rôle important dans la réponse immunitaire primaire. Ces cellules sont responsables, entre autres, de la reconnaissance et de l'élimination des pathogènes étrangers et du recrutement d'autres cellules immunitaires par la libération de cytokines (Chanput et al., 2014).

Les pathogènes comme les virus, les bactéries et les champignons sont souvent impliqués à côté des pesticides dans la perte des pollinisateurs. Les pesticides pourraient interférer directement avec les cellules du système immunitaire et entraîner une réponse immunitaire plus faible de l'organisme hôte et donc un impact accru des pathogènes. En gardant cette hypothèse à l'esprit, l'IMI pourrait également interférer avec les cellules du système immunitaire des vertébrés. Par conséquent, la réactivité des macrophages du système

immunitaire de trois invertébrés pollinisateurs (*Apis mellifera*, *Bombus terrestris* et *Drosophila melanogaster*) et de l'Homme, représentant les vertébrés, exposés à l'imidaclopride sera comparée. Les cellules seront exposées à l'IMI en tant qu'ingrédient actif et dans sa formulation commerciale, « le Confidor vert ». Après avoir examiné la réactivité cellulaire pendant l'exposition à ces substances chimiques, l'attention se portera sur la réactivité cellulaire des cellules soumises à un stress biologique comme un pathogène.

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre parties. Dans un premier temps, une analyse bibliographique présentera l'état actuel des connaissances sur les néonicotinoïdes et leur immunotoxicité sur les quatre organismes ainsi que la problématique des études sur la molécule active, l'imidaclopride, et son produit commercial. La seconde partie sera consacrée aux matériels et aux méthodes qui ont été employés pour répondre aux objectifs de la thèse. Ensuite, seront présentés les résultats obtenus à partir des différentes expérimentations ainsi que leurs analyses. Enfin, une dernière partie présentera la conclusion générale et les perspectives de ces travaux de thèse.





# **ETAT DE L'ART**

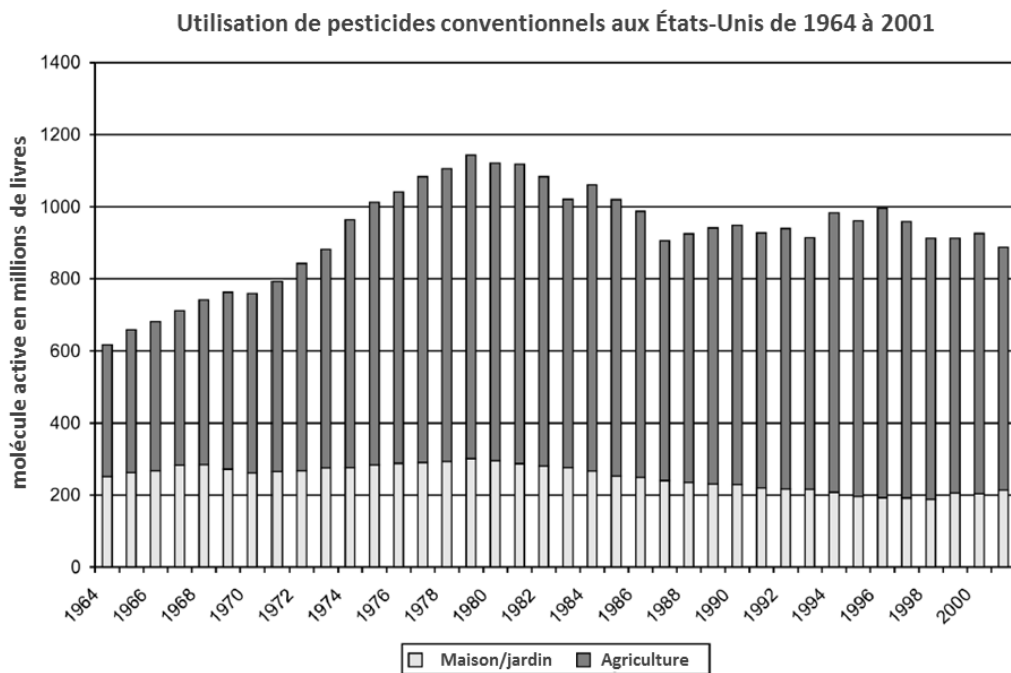


## 2. ETAT DE L'ART

### 2.1. Pesticides

Les pesticides sont des substances chimiques utilisées pour éliminer ou inhiber la croissance d'organismes nuisibles considérés comme néfaste ou irritants (EPA, 2015). La protection des plantes ou des récoltes en agriculture est généralement la première pensée qui vient à l'esprit quand on entend le mot « pesticide ». Mais l'utilisation des pesticides ne se limite pas qu'à la protection des plantes. Ils sont également utilisés pour prévenir, contrôler ou détruire tout organisme considéré comme un ravageur, tels que les vecteurs de maladies humaines ou animales, les plantes ou animaux indésirables ou les parasites sur les animaux, humains et végétaux. Le terme « pesticide » comprend donc de nombreuses substances différentes qui peuvent être classées en fonction de leur utilisation pratique ou de leurs propriétés chimiques. La classification la plus courante est basée sur leur utilisation pratique : ils peuvent être classés comme microbicides, zoocides et herbicides. L'EPA regroupe les pesticides, sans toutefois s'y limiter, dans les groupes suivants (EPA) :

- Fongicides, contre les champignons
- Biocides, contre les microorganismes
- Désinfectants, contre les microorganismes pathogènes sur les objets inanimés
- Insecticides, contre les insectes et autres arthropodes
- Rodenticides, contre les rats et autres rongeurs
- Attractifs, pour capturer et attirer les ravageurs vers un piège
- Les défoliants des plantes, pour faire tomber les feuilles ou le feuillage d'une plante
- Fumigent, du gaz ou de la vapeur pour éliminer les insectes nuisibles
- Les régulateurs de croissance des plantes, qui modifient la croissance, la floraison ou la reproduction des plantes



**Figure 1: Tendances de l'utilisation des pesticides aux États-Unis de 1964 à 2001 en millions de livres de matière active (d'après Goldman, 2007).**

La nécessité et l'utilisation de substances pour protéger les récoltes agricoles remontent à des milliers d'années. En Chine, un mélange de chaux, de cendre de bois et de craie a été utilisé pour tuer les insectes endommageant les plantes cultivées vers 3000 ans avant J.-C. Le dioxyde de soufre et le soufre d'ébarbage ont également servi le même propos alors qu'au 15<sup>ème</sup> siècle les insectes étaient éliminés par l'arsenic (Matolcsy et al., 1989). Mais il a fallu attendre le 19<sup>ème</sup> siècle pour que les pesticides organiques modernes fassent l'objet de recherches actives dans les laboratoires chimiques et les années 1930 pour qu'ils soient introduits sur le marché. Ces premiers pesticides comprenaient notamment le DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) qui a révolutionné la lutte contre le paludisme pendant la seconde guerre mondiale. Le DDT est un pesticide organochloré contenant au moins un atome de chlore dans sa structure moléculaire. D'autres pesticides ont suivi : au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, les pesticides organophosphorés ont été développés, un atome de phosphore remplaçant les atomes de chlore. Le plus populaire d'entre eux était « le Parathion » (Boucher, 2016). Les pesticides organiques modernes sont devenus de plus en plus populaires en agriculture et dans la lutte antiparasitaire dans les maisons et les jardins, avec un sommet historique en 1979 aux États-Unis (Figure 1). Les États-Unis, par exemple, ont utilisé 1,1 milliards de livres d'ingrédients

actifs de pesticides au cours de la même année, doublant presque leur quantité en seulement 15 ans (Goldman, 2007).

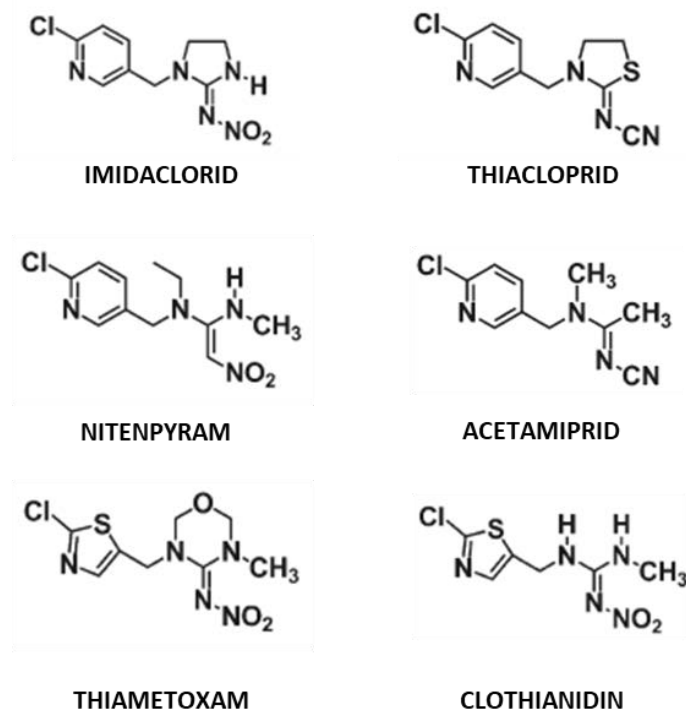
Ce n'est qu'en 1962, le livre « Silent Spring » de Rachel Carsen a attiré l'attention du public sur le problème environnemental des pesticides. Les drogues miracles contre les insectes et autres ravageurs semblaient ainsi nuire gravement à l'environnement en endommageant non seulement les organismes nuisibles pour lesquels ils étaient utilisés, mais aussi d'autres organismes non ciblés. De plus, ces pesticides organiques très persistants dans l'environnement se propageaient le long de la chaîne alimentaire, causant des dommages aux oiseaux, aux poissons, aux mammifères et aux Hommes. La Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (POP), traité international sur l'environnement visant à restreindre et à interdire l'utilisation des POP, mentionne plusieurs pesticides comme, par exemple, l'aldrine, l'endrine, la dieldrine, le chlordécone, le chlordane, le heptachlore ou le lindane. Le pesticide « Agent Orange » (2,4,5-T) a ainsi provoqué de graves problèmes de santé, surtout pendant la guerre du Vietnam, conduisant à l'intoxication de la population vietnamienne aux dioxines. Certaines dioxines affectent en effet le système immunitaire et causent des cancers ainsi que des problèmes de reproduction et de développement. Aujourd'hui encore, la population vietnamienne est touchée par cette contamination, car les dioxines sont encore présentes dans les aliments et les sols (Mai et al., 2007; Schechter et al., 2003). En raison des préoccupations croissantes en ce qui concerne la santé, un grand nombre de ces pesticides ont été interdits dans les années 1970 et 1980, notamment les pesticides contenant des métaux toxiques comme le plomb, l'arsenic et le thallium (Goldman, 2007). À partir des années 1980, les quantités de pesticides utilisées ont diminué (Figure 1). Toutefois, cette réduction n'est pas due à un besoin réduit en pesticides, mais à des substances plus puissantes qui ont suivi les pesticides interdits. Ces nouveaux insecticides puissants appartenaient à la famille des carbamates, dont le cabaryle, le dimétan et le méthiocarbe, qui étaient extrêmement efficaces contre les insectes. Les carbamates ont été suivis par les pyréthroïdes, puis dans les années 1990 par les néonicotinoïdes, qui imitent la molécule de nicotine et agissent comme neurotoxines.

### 2.1.1. Néonicotinoïdes

Lancé sur le marché par Bayer Crop Science en 1991, l'imidaclopride (IMI) était le premier d'un nouveau groupe de pesticides : les néonicotinoïdes (Mason et al., 2013). A la fin des années 1980, le marché mondial des insecticides était dominé par les carbamates, les organophosphates et les pyréthroïdes, auxquels de nombreux insectes nuisibles ont développé une résistance croissante (Simon-Delso et al., 2015). Les néonicotinoïdes ont rapidement dominé le marché des insecticides : en 2010, ils représentaient plus de 25 % du marché, l'imidaclopride étant le deuxième pesticide le plus vendu dans le monde après le glyphosate (Jeschke et al., 2010). Malgré l'interdiction de l'imidaclopride, de la clothianidine et du thiaméthoxame pour application en plein air (ils sont toujours autorisés dans les serres) dans l'Union européenne en mai 2018 (Journal officiel de l'Union européenne, L 132/31, 2018), l'imidaclopride reste un des insecticides les plus utilisés dans le reste du monde : 75 % des néonicotinoïdes sont utilisés en Amérique latine, en Amérique du Nord et en Asie, l'Europe ne représentant que 11 % de l'utilisation mondiale avant son interdiction (Bass et al., 2015). Leur succès rapide est dû à leur efficacité élevée contre les insectes suceurs avec des valeurs de  $DL_{50}$  (dose létale à laquelle 50 % d'une population meurent) bien inférieures à celles des composés organophosphorés ou carbamates (Suchail et al., 2001), par exemple, on peut relever dans la littérature que la  $DL_{50}$  la plus forte est de 102 ng par abeille (voir Annexe 1 pour plus des valeurs  $DL_{50}$ ; Nauen et al., 2001) alors que la  $DL_{50}$  relevée pour les organophosphorés (diméthoate) est de 152 ng par abeille (Suchail et al., 2001).

Les insecticides néonicotinoïdes, qui comprennent l'imidaclopride, la clothianidine, le thiaméthoxane, l'acétamipride, le nitenpyram et le thiaclopride (Figure 2), se lient fortement aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) du système nerveux central des insectes et sont mortels par perturbation du système nerveux. Bien que de faibles concentrations puissent provoquer une stimulation nerveuse, des concentrations plus élevées entraînent le blocage des récepteurs, la paralysie et la mort de l'insecte (Tomizawa and Casida, 2005). Les néonicotinoïdes sont considérés comme moins nocifs pour les mammifères, car ils se fixent plus faiblement aux nAChR des vertébrés qu'à ceux des insectes (Suchail et al., 2001).

Tous les néonicotinoïdes sont des insecticides systématiques ayant une solubilité élevée dans l'eau (solubilité d'IMI dans l'eau à 20°C et à pH 7 est de 610 mg/L) et entraînant l'absorption du pesticide par les tissus de la plante (Bonmatin et al., 2015). La molécule active agit donc directement sur tout insecte suceur qui se nourrit de la plante. De plus, comparativement aux pesticides organophosphorés ou carbamates qui sont plus efficaces par exposition de contact, les néonicotinoïdes sont plus toxiques par ingestion orale avec un DL<sub>50</sub> par voie orale entre 41 et 81 ng par abeille et un DL<sub>50</sub> par voie contact entre 49 et 102 ng par abeille (Nauen et al., 2001). Une fois distribués dans toute la plante, ils sont également disponibles pour les insectes non ciblés comme les insectes pollinisateurs, qui se nourrissent de nectar et de pollen contaminés (Simon-Delso et al., 2015).



**Figure 2: structure chimique de 6 insecticides néonicotinoïdes (d'après Casida 2010).**

L'application et la dissémination les plus courantes des néonicotinoïdes en agriculture sont l'utilisation d'enrobages ou de pansements de semences qui génèrent des poussières toxiques pendant le semis et peuvent entraîner une contamination de la végétation environnante (Bonmatin et al., 2015). Ils sont également utilisés contre les insectes suceurs dans les cultures fruitières et maraîchères ainsi que dans la viticulture et la culture du houblon. Les résidus

d'imidaclopride et d'autres néonicotinoïdes peuvent aussi être trouvés dans des fruits et légumes (Obana et al., 2002). Fernández-Alba et ses collaborateurs (2000) ont mesuré entre 0,01 à 0,3 µg/g d'imidaclopride dans des tomates, des concombres et des poivrons après une semaine d'application de l'insecticide, tandis que Ko et ses collaborateurs (2014) ont relevé 0,5 µg/g dans des feuilles de salade. De l'imidaclopride et ses résidus ont également été retrouvés dans des produits comme dans le miel (71,4 ng/g d'imidaclopride 5-hydroxy; Codling et al., 2016) et le pollen des abeilles (206 ng/g d'imidaclopride ; pour plus des valeur voir Annexe 2 ; Chauzat et al., 2009; Codling et al., 2016; David et al., 2016; Hladik et al., 2016; Kasiotis et al., 2014; Mullin et al., 2010). Les néonicotinoïdes, très solubles dans l'eau ainsi que ses résidus ont également été trouvés dans des rivières des États-Unis et du Canada tout au long de l'année (Anderson et al., 2015; Hladik et al., 2014, 2018). En général, les néonicotinoïdes diminuent assez rapidement après l'application, car ils sont photodégradables dans l'eau (la photolyse aqueuse DT50 à pH 7 est de 0,2 jours), mais dans certaines conditions du sol, ils peuvent persister plus longtemps (Bonmatin et al., 2015). En effet, la sorption de l'imidaclopride dans le sol est en corrélation positive avec la matière organique et la teneur en argile minérale du sol. La persistance environnementale est plus élevée dans des conditions sèches et fraîches (Bonmatin et al., 2015). Dans ces conditions, l'imidaclopride peut être présent dans le sol jusqu'à 997 jours (Gervais et al., 2010). L'Agence canadienne de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA) a classé l'IMI parmi les polluants persistants (Anderson et al., 2015).

Plusieurs métabolites des néonicotinoïdes, en particulier ceux de l'imidaclopride, sont connus pour être actifs chez les invertébrés et les mammifères (Simon-Delso et al., 2015). Outre leur toxicité aiguë, ils provoquent une toxicité chronique qui entraîne des effets sublétaux sur les vertébrés et les invertébrés qui peuvent s'exprimer par des symptômes variés : Medrzycki et ses collaborateurs (2003) ont, par exemple, révélé que des doses sublétales d'imidaclopride modifiaient la mobilité et la capacité de communication des abeilles traitées. On suppose également que l'intoxication sublétales par les néonicotinoïdes peut entraîner un affaiblissement global de l'organisme. (Casida, 2010)



### 2.1.2. Produit commercial vs. Molécule active

Avant qu'un pesticide puisse être lancé sur le marché européen, il doit être autorisé par la législation de l'Union Européen. Cette autorisation est soumise à un double système, dans lequel l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) évalue la substance active du pesticide et les États membres évaluent puis autorisent le produit au niveau national. Le fabricant qui demande l'approbation d'une molécule active joint à sa demande des données et des études pertinentes précisées par l'EFSA. Après l'examen de la demande, l'EFSA établit ses conclusions dans un rapport qui est ensuite transmis à la Commission européenne, qui décide d'ajouter l'ingrédient à la liste des substances actives approuvées par l'UE (EFSA : How Pesticides are regulated in the EU). Selon l'EFSA, les critères d'approbation sont que la molécule n'a « aucun effet nocif immédiat ou différé sur la santé humaine ou animale, directement ou par l'intermédiaire de l'eau potable, des denrées alimentaires, des aliments pour animaux ou de l'air, ni aucun effet inacceptable sur l'environnement, en particulier sur les espèces non visées et la biodiversité ».

La toxicité des pesticides pour les pollinisateurs est généralement déterminée par des seuils de concentration tels que les DL/DE/CL/CE<sub>50</sub> (dose létale, dose avec effet, concentration létale et concentration avec effet auxquelles 50 % de la population sont concernées). Toutefois, ces études ne portent que sur la substance active du pesticide bien qu'en général, le produit commercial lancé sur le marché ne contienne que 40 à 70 pour cent du composé actif complété par des substances dites additives ou ingrédients inertes (EPA). Ces ingrédients inertes sont des substances qui sont ajoutées au produit pour le rendre plus efficace et augmenter ses performances. Il peut s'agir de solvants qui augmentent la biodisponibilité de la molécule active, pour favoriser l'assimilation de l'ingrédient actif par la plante ou l'animal. Mais ils peuvent également stabiliser le produit, prolonger sa durée de vie ou améliorer la sécurité de l'utilisateur. Les ingrédients inertes ne doivent pas nécessairement être toxiques et doivent également être autorisés indépendamment de la substance active par les autorités (EPA). Cependant, aux États-Unis, les fabricants ne sont pas obligés d'étiqueter les ingrédients inertes sur leurs produits (EPA). Il est alors difficile de retracer les ingrédients qui sont effectivement présents dans les formulations commerciales, d'autant plus que 90 % de ces

additifs sont considérés comme secret de fabrication (Weinhold, 2010). Une autre difficulté pour déterminer la toxicité des pesticides, est qu'une molécule active est disponible dans de nombreuses formulations commerciales différentes. L'imidaclopride se trouve, par exemple, dans les produits suivants : Gaucho, Confidor, Admire, Connect, Evidence, Leverage, Muralla, Provado et Trimax. Par contre, en France, la réglementation oblige les fabricants à indiquer sur les fiches de sécurité la présence des composés toxiques : le produit commercial Confidor vert contient 200 g/L d'imidaclopride et de 10 % à 25 % de carbonate de propylène (PC). Le carbonate de propylène est un composé organique utilisé comme solvant polaire qui présente aussi une toxicité propre (DL<sub>50</sub> 3 g/kg, Safety Data Sheet PC). On peut noter que sa concentration exacte n'est pas fournie.

Selon des produits commerciaux nous trouvons différentes substance des additifs comme par exemple le PC du Confidor vert, le glycérine du Confidor ou le 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one du Gaucho. Ces différents additifs peuvent accroître les effets indésirables de la molécule active et les pesticides peuvent alors constituer une menace plus importante pour l'environnement dans la formulation commerciale que dans leur molécule active. Costa et ses collaborateurs (2009) ont montré des effets plus importants sur les lymphocytes humains exposés *in vitro* à un produit commercial qu'à l'IMI lui-même. Dans une autre étude, Beggel et ses collaborateurs (2010) ont comparé les pesticides bifenthrine et fipronil à leurs formulations commerciales Talstar® et Termidor® respectivement. Ils ont constaté que la formulation des deux pesticides avait un impact plus important sur la performance de nage des larves de poissons que leur molécule active. Dans le cas de Talstar®/bifenthrine, la formulation était cinq fois plus toxique que la molécule active elle-même.

Alors que pour Mayer et Ellersieck (1986) 32 % des mélanges commerciaux de pesticides sont plus toxiques que la molécule active, des études plus récentes ont montré que plus de 90 % des produits commerciaux présentaient une toxicité croissante par rapport à leur molécule active pure. Ces résultats suggèrent que la toxicité finale dépend du mélange de composés entrant dans la formulation réelle du produit commercialisé (Beggel et al., 2010) en raison des effets cumulatifs de ses multiples ingrédients.

### 2.1.3. Effondrement des colonies d'abeilles

L'agriculture dépend fortement des services de pollinisation des insectes car environ 84 % des cultures (un tiers de la production alimentaire mondiale) sont pollinisées par les insectes (Allsopp et al., 2008; Klein et al., 2007). L'abeille domestique (*Apis mellifera*) est souvent considérée comme le plus important des invertébrés pollinisateurs (Allsopp et al., 2008; Gisder et al., 2010; Pettis et al., 2012) car elle est le pollinisateur domestique le plus commun et car elle a une valeur économique très importante (Allsopp et al., 2008).

Ces dernières années, les insectes pollinisateurs, en particulier les abeilles domestiques, ont été la cible principale de nombreuses études visant à déterminer la cause des pertes soudaines de colonies au niveau mondial (Figure 3) (Genersch et al., 2010; Neumann and Carreck, 2010). Ce phénomène, généralement appelé trouble de l'effondrement des colonies (CCD ; Bromenshenk et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2009), a été particulièrement surveillé sur les abeilles (*Apis mellifera*) en raison de leur importance culturelle et économique (Allsopp et al., 2008). Il se caractérise par la perte soudaine de colonies d'abeilles où les ruches semblent avoir été abandonnées par leurs travailleurs, laissant dans la ruche des ressources abondantes et un couvain sain (Bromenshenk et al., 2010). Cependant, non seulement les abeilles mellifères mais aussi les autres pollinisateurs comme les bourdons (*Bombus spp.*) sont affectés ce qui entraîne une perte de biodiversité au niveau mondial (Potts et al., 2015). Comme les espèces d'abeilles spécialisées dépendent de moins d'espèces végétales que les pollinisateurs généralistes comme les abeilles mellifères, les premières sont souvent plus touchées par ces pertes.



**Figure 3 : les pertes de colonies d'abeilles (CCD) signalées dans le monde (Neumann & Carreck, 2010)**

Le CCD représente toujours un risque majeur pour les colonies d'abeilles dont il faut encore trouver les causes (Bromenshenk et al., 2010). De nombreuses hypothèses ont été formulées en mentionnant le changement climatique, la perte d'habitat, les pathogènes et l'exposition aux pesticides. Il n'existe encore aucune preuve réelle que l'une de ces causes pourrait en être seule responsable des phénomènes observés (Potts et al., 2010).

En effet, l'exposition à des pathogènes comme les bactéries, les virus, les champignons et les parasites a augmenté dans les colonies d'abeilles au cours des dernières années, ce qui a été considérée comme une cause majeure de ce déclin (Bromenshenk et al., 2010; Gisder et al., 2010). Le virus israélien de la paralysie aiguë (IAPV) a ainsi été considéré comme une cause potentielle de CCD, mais on a constaté qu'il était présent aux États-Unis bien avant l'apparition du CCD sur le continent américain (Bromenshenk et al., 2010). Le parasite *Varroa destructor*, qui est l'un des principaux ravageurs des abeilles (Martin, 2001; Rinkevich et al., 2017), et la loque américaine, qui est également une maladie importantes des abeilles (Yue et al., 2008), ont aussi été évoqués bien que rien n'indique qu'un seul d'entre eux soit directement responsable du CCD (Nazzi et al., 2012). L'espèce microsporidienne *Nosema sp*, un champignon pathogène pour les abeilles très évolué, a aussi été décrit (Gisder et al., 2010, 2011). En Europe et aux États-Unis, la dissémination de *Nosema ceranea*, que l'on croyait être un pathogène uniquement chez l'abeille asiatique *Apis ceranea*, a été documentée ces dernières années (Chen et al., 2008; Paxton et al., 2007). Alors que les scientifiques espagnols ont corrélé l'effondrement de la colonie à l'infection par ces champignons (Higes et al., 2008), il n'a pas pu être corrélé au déclin aux Etats-Unis (Bromenshenk et al., 2010). Gisder et al (2010) présume aussi que la propagation de *Nosema ceranea* pourrait être influencée par le changement climatique, car elle est plus adaptée aux températures élevées.

Outre les agents pathogènes, la menace pour les abeilles mellifères et autres invertébrés pollinisateurs repose aujourd'hui sur l'utilisation généralisée des pesticides en agriculture (Chauzat et al., 2009; Goulson et al., 2015) : 130 pesticides différents ont ainsi été trouvés dans les ruchers (Mullin et al., 2015). Des études ont montré que, surtout pendant la période d'application des pesticides sur les champs, les abeilles peuvent souffrir d'une toxicité aiguë (Marzaro et al., 2011; Sanchez-Bayo and Goka, 2016), mais que pendant la période de

butinage, période à laquelle les abeilles sont pourtant exposées à des pesticides systémiques, la mortalité par ingestion est soit non significative soit faible (Cresswell, 2011).

Le groupe d'insecticides le plus couramment utilisé est celui des néonicotinoïdes (Bonmatin et al., 2015). Des résidus de ceux-ci ont été trouvés dans des pollinisateurs comme les abeilles domestiques, les bourdons et les abeilles solitaires (voir Annexe 2 pour les concentrations trouvées; Codling et al., 2016; David et al., 2016; Hladik et al., 2016). Plusieurs auteurs (Chauzat et al., 2009; Kasiotis et al., 2014) ont détecté 5,7 à 73,9 ng/g d'imidaclopride dans le pollen, tandis que les valeurs de DL<sub>50</sub> pour les abeilles domestiques variaient de 4,5 ng à 81 ng/abeille pour une ingestion orale (Cresswell, 2011; Nauen et al., 2001) et de 18 ng à 102 ng/abeille par contact (Iwasa et al., 2004; Nauen et al., 2001). Même si les concentrations dans l'environnement sont plutôt faibles comparativement aux concentrations de toxicité aiguë, elles peuvent entraîner des effets sublétaux dans l'organisme exposé (Chaimanee et al., 2016; Chauzat et al., 2009; Desneux et al., 2007).

Plusieurs études ont déjà montré un effet affaiblissant des néonicotinoïdes sur les pollinisateurs face aux pathogènes (Abbo et al., 2017; Alaux et al., 2010; Fauser-Misslin et al., 2014; Pettis et al., 2012; Vidau et al., 2011). Les abeilles exposées simultanément au fipronil ou au thiaclopride et à l'agent pathogène de l'intestin *Nosema ceranea* ont affiché des taux de mortalité plus élevés que les abeilles exposées aux pesticides seuls ou à l'agent pathogène seul (Vidau et al., 2011). De plus, les abeilles étaient plus infestées par cet agent pathogène de l'intestin lorsqu'elles étaient exposées à l'IMI ou au thiaclopride que les abeilles sans exposition aux pesticides (Pettis et al., 2012). En effet, Brandt et al. (2016), Christen et al. (2016), Di Prisco et al. (2013) et López et al. (2017) ont démontré que les néonicotinoïdes affectent l'immunocompétence des abeilles. L'IMI et le thiaclopride réduisent la densité des hémocytes, la réponse d'encapsulation et l'activité antimicrobienne aux concentrations réalistes dans des conditions naturelles (Brandt et al. 2016) bien que les abeilles n'aient été confrontées qu'aux pesticides et non aux agents pathogènes dans cette étude. Lorsque les larves ont été confrontées au clothianidine et à *Paenibacillus larvae ssp.*, la loque américaine, López et al. (2017) ont observé une diminution de la réponse cellulaire (nombre total et différentiel d'hémocytes) tandis que la clothianidine ou *P. larvae* aux eux seuls ont entraîné une augmentation de la réponse cellulaire comparativement à un groupe témoin. Cependant,

l'effet des pesticides sur la réponse cellulaire immunitaire des pollinisateurs et sur une réaction immunitaire simultanée aux agents pathogènes n'est pas encore bien comprise (Collison et al., 2016).

On peut donc supposer que ce n'est pas un seul facteur de stress qui est responsable du déclin des pollinisateurs, mais plus probablement une combinaison de plusieurs agents, comme l'association du changement climatique, de la perte d'habitat, de pathogènes et de pesticides (Alaux et al., 2010; VanEngelsdorp et al., 2010).

#### 2.1.4. Déficiences immunitaires chez d'autres invertébrés et vertébrés

Le phénomène du déclin observé pour l'abeille mellifère ne se limite pas seulement aux espèces d'abeilles ou aux pollinisateurs en général. On observe également une perte globale de la biodiversité animale, qui affecte globalement les insectes et autres arthropodes (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019). La perte de biodiversité chez les vertébrés a sans doute attiré davantage l'attention du public au cours du siècle dernier, mais compte tenu de la répartition taxonomique, les insectes représentent les deux tiers de toutes les espèces animales, alors que les espèces vertébrées ne représentent qu'environ 2 % de ces espèces. Les taxons d'insectes les plus touchés par ce déclin mondial sont les lépidoptères, les hyménoptères et le scarabée des déjections (coléoptères). Les principales causes de ce déclin sont la perte d'habitat due à l'agriculture intensive et à l'urbanisation, la pollution par les insecticides systémiques et le changement climatique (Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019). Sanchez-Bayo et Wyckhuys (2019) ont projeté que nous pourrions perdre jusqu'à 40 % des espèces d'insectes au cours des prochaines décennies. En Californie, Forister et ses collaborateurs (2016) ont établi une corrélation positive entre le déclin des papillons, qui ont été surveillés au cours des quatre dernières décennies, et l'utilisation des néonicotinoïdes.

La suppression de la réponse immunitaire aux maladies infectieuses par les néonicotinoïdes a été démontrée non seulement pour les pollinisateurs (Brandt et al., 2016 ; Di Prisco et al., 2013 ; López et al., 2017) mais aussi pour les vertébrés insectivores comme les amphibiens,

les oiseaux, les poissons et les mammifères, lorsque l'on compare les épidémies avec l'utilisation des néonicotinoïdes dans les régions et pays concernés (Mason et al., 2013). Une étude de Sánchez-Bayo et Goka (2005) a montré que l'espèce de poisson médaka (*Oryzias latipes*) exposée à l'imidaclopride, le néonicotinoïde le plus couramment utilisé, étaient massivement infestée par un ectoparasite *Trichodina*, comparativement aux groupes témoins sans pesticides et aux groupes exposés au zinc pyrethrine. Kiesecker (2002) a montré dans une étude de 2002 que la déformation des membres des grenouilles était causée par un effet combiné des pesticides et d'une infection par des trématodes. Mason et al. (2013) établissent également un lien entre plusieurs autres éclosions d'agents pathogènes mortels chez les amphibiens et l'intensification de l'utilisation des néonicotinoïdes dans les régions touchées. Le déclin des oiseaux a également été mis en relation avec les pesticides et les néonicotinoïdes (Goulson, 2014). Des corrélations ont été trouvées entre les fortes concentrations d'IMI dans les eaux de surface et le déclin croissant des oiseaux aux Pays-Bas (Hallmann et al., 2014). Hallmann et al. ont également déclaré dans leurs travaux que le déclin des oiseaux a commencé au début des années 1990, juste après l'introduction des néonicotinoïdes aux Pays-Bas. Les chauves-souris, elles aussi ont été infectées par un champignon, normalement peu dangereux, soudainement devenu mortel pour les populations de chauves-souris des États-Unis et (Mason et al., 2013). Enfin des expériences en laboratoire avec des mammifères et des poissons ont montré que les néonicotinoïdes induisaient des réponses immunitaires pro-inflammatoires, un stress oxydatif ainsi qu'une répllication virale accrue chez l'organisme hôte (Duzguner and Erdogan, 2012; Hernandez et al., 2018; Özdemir et al., 2018).

D'autres études appuient également l'hypothèse (Gibbons et al., 2015; Goulson, 2013) selon laquelle l'imidaclopride et la clothianidine exercent des effets sublétaux sur les vertébrés allant d'effets génotoxiques ou cytotoxiques et d'une altération de la fonction immunitaire à une réduction de la croissance du succès reproducteur. Plusieurs revues scientifiques ont mentionné des maladies chroniques humaines comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou des maladies auto-immunes qui pourraient aussi être liées à une exposition sublétaux aux insecticides, herbicides et fongicides (Corsini et al., 2013; Mokarizadeh et al., 2015; Mostafalou and Abdollahi, 2013, 2017). La prédiction des effets sur la santé humaine est difficile car les études *in vivo* sont très rares. Corsini et al. (2007) ont

montré dans une étude que les agriculteurs exposés ont montré une réponse inflammatoire au propanil, ce qui a également été confirmé par des analyses *in vitro* ultérieures du même pesticide dans les lymphocytes du sang périphérique humain. Même une exposition de courte durée à de faibles concentrations de pesticides pourrait être particulièrement dangereuse pendant l'embryogenèse, lors du développement du système immunitaire (Corsini et al., 2013). Cimino et ses collaborateurs (2016) ont cité huit études sur l'exposition chronique à l'imidaclopride montrant des effets nocifs sur la santé humaine, mais on en sait encore peu sur les effets immunotoxiques des néonicotinoïdes chez l'Homme et d'autres recherches sont nécessaires pour bien comprendre leurs effets sur la santé de l'Homme.



## 2.2. Système immunitaire

Les organismes supérieurs comme les plantes et les animaux ont élaboré une stratégie de défense pour éliminer les facteurs de stress environnementaux et plus particulièrement les pathogènes (Menezes and Jared, 2002). Pour ce faire, le système immunitaire doit faire la distinction entre les antigènes des différents types de pathogènes et le matériel de l'organisme, brièvement entre soi et le non-soi (Feldhaar and Gross, 2008). La fonction du système immunitaire est donc d'éliminer les matières étrangères qui ne sont pas présentes naturellement dans l'organisme et qui pourraient lui nuire (Farmer et al., 1986). L'immunité est donc la résistance d'un individu contre les infections microbiennes d'origine bactérienne ou virale, les parasites comme les champignons ou les vers, la prolifération maligne ou toute matière étrangère (Chatenoud and Bach, 2012).

Même si les mécanismes de défense fonctionnelle ne sont pas les mêmes chez les vertébrés et les invertébrés, on peut trouver plusieurs similitudes (Evans et al., 2006). Il y a d'abord les barrières physico-chimiques, comme la peau ou la cuticule des insectes, pour empêcher les antigènes de pénétrer dans l'organisme (Menezes & Jared, 2002). Il y a aussi le système immunitaire inné avec le système cellulaire et humoral qui montre une réponse immédiate et rapide aux antigènes mais qui n'est pas très spécifique de l'antigène (Feldhaar and Gross, 2008; Marmaras and Lampropoulou, 2009). Par contre le système immunitaire adaptatif, qui réagit de manière très spécifique aux antigènes en raison de sa capacité à mémoriser les facteurs de stress rencontrés (Beutler, 2004) semble absent chez les insectes. Ceux-ci ne comptent que sur leur système immunitaire inné (Aderem and Ulevitch, 2000; Feldhaar and Gross, 2008). La raison pourrait être trouvée dans le développement évolutif des deux systèmes immunitaires. L'immunité adaptative est apparue beaucoup plus tard que l'immunité innée, ce qui a entraîné une forte connexion et une frontière très vague entre les deux systèmes immunitaires : de nombreuses réponses immunitaires adaptatives sont construites sur l'immunité innée (Turvey and Broide, 2010). Plus ancien, le système immunitaire inné est présent dans tous les organismes multicellulaires alors que le système immunitaire adaptatif n'est présent que chez les poissons à mâchoires et tous les vertébrés « supérieurs » (Beutler, 2004 ; Turvey & Broide, 2010). Malgré tout, un analogue de

l'immunité adaptative chez les insectes a récemment été découvert chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*) avec le transfert de l'immunité par la mère à leurs petits (Salmela et al., 2015). Bien que le système immunitaire inné ne présente pas la spécificité élevée du système immunitaire adaptatif, il est tout de même suffisamment spécifique pour identifier les pathogènes et différencier le soi du non-soi (Feldhaar et Gross 2008).

### 2.2.1. Détection des pathogènes

Les premières barrières contre les agents pathogènes envahissants sont les barrières physico-chimiques : afin d'empêcher les microbes de pénétrer dans le corps, les insectes sont recouverts d'une cuticule dure et de couches épithéliales (Evans and Spivak, 2010) et possèdent un tube digestif qui est la surface la plus vulnérable car il est en contact permanent avec les bactéries (Feldhaar & Gross, 2008). Chez les vertébrés « supérieurs », la peau et les muqueuses sont l'équivalent de la cuticule dure et de couches épithéliales des insectes. Elles sont constituées de cellules épithéliales pavimenteuses stratifiées. De plus, la muqueuse peut sécréter des peptides antimicrobiens et des macrophages résidents la défendent des pathogènes (Censoplano et al., 2014). Si des agents pathogènes sont capables d'envahir l'organisme, le système immunitaire inné doit d'abord détecter les antigènes potentiellement nocifs. Chez les vertébrés et les invertébrés, cette reconnaissance des antigènes est induite par les récepteurs de reconnaissance de formes (PRR - pattern recognition receptor) (Censoplano et al., 2014; Evans and Spivak, 2010; Feldhaar and Gross, 2008). Ces PRR sont exprimés sur différents types de cellules et activent des voies de transcription pour la production de cytokines et autres protéines immunitaires (Censoplano et al., 2014). Le système immunitaire inné a trois stratégies différentes pour détecter les pathogènes. Tout d'abord, les PRR sont capables de détecter les structures moléculaires « non-soi », appelées PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) (Turvey & Broide, 2010) ou MAMP's (microbe-associated molecular pattern) (Evans & Spivak, 2010). Ces PAMPs ou MAMPs sont des structures moléculaires qui sont exprimées sur la paroi cellulaire du micro-organisme, comme les peptidoglycanes bactériens ou les glucanes fongiques (Feldhaar & Gross, 2008). De

plus, les PRRs peuvent détecter les molécules qui sont libérées lors de la lyse cellulaire et des lésions tissulaires et ainsi signaler un danger. Ces structures sont appelées modèles moléculaires associés aux dommages (DAMP) et sont des conséquences métaboliques courantes d'une infection (Turvey & Broide, 2010). Concernant la troisième stratégie, le système immunitaire inné détecte les molécules manquantes qui sont normalement produites par des cellules saines. Lorsqu'elles sont produites, ces molécules forment une réaction inhibitrice des réponses immunitaires (Turvey and Broide, 2010).

### 2.2.2. Système immunitaire inné

En général, le système immunitaire inné peut être divisé entre le bras humoral et le bras cellulaire. Cependant, il est difficile de trouver la limite concrète entre les deux systèmes car ils interagissent et s'influencent en même temps (Feldhaar & Gross, 2008). Le bras humoral se compose de toutes les macromolécules et substances, comme les peptides antimicrobiens solubles, les cytokines et d'autres protéines que l'on trouve dans l'humeur extracellulaire de l'organisme et qui provoquent des réponses immunitaires (Censoplano et al., 2014). Le bras cellulaire du système immunitaire inné est basé sur des cellules circulant dans le sang des vertébrés ou dans l'hémolymphe des insectes (Marmaras & Lampropoulou, 2009).

#### *2.2.2.1. Branche cellulaire du système immunitaire*

Chez les insectes comme chez l'Homme, les cellules du système immunitaire inné proviennent des cellules hématopoïétiques du sang ou de l'hémolymphe (Marmaras and Lampropoulou, 2009; Turvey and Broide, 2010). Chez l'homme, les cellules de l'immunité innée sont formées à partir de cellules myéloïdes qui peuvent se développer en plusieurs cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et également les monocytes dérivant en macrophages (Beutler, 2004; Turvey and Broide, 2010). Les macrophages sont capables de phagocytose et sont donc capables

d'éliminer les microbes en les phagocytant (Beutler, 2004). Cela leur permet également d'éliminer les cellules endommagées et de contribuer ainsi à la réparation des tissus (Censoplano et al., 2014). Comme les macrophages sont capables de sécréter une grande quantité de cytokines, un autre de leur rôle important peut aussi être la régulation (Beutler, 2004) car ils renforcent la réponse immunitaire innée (Censoplano et al., 2014).

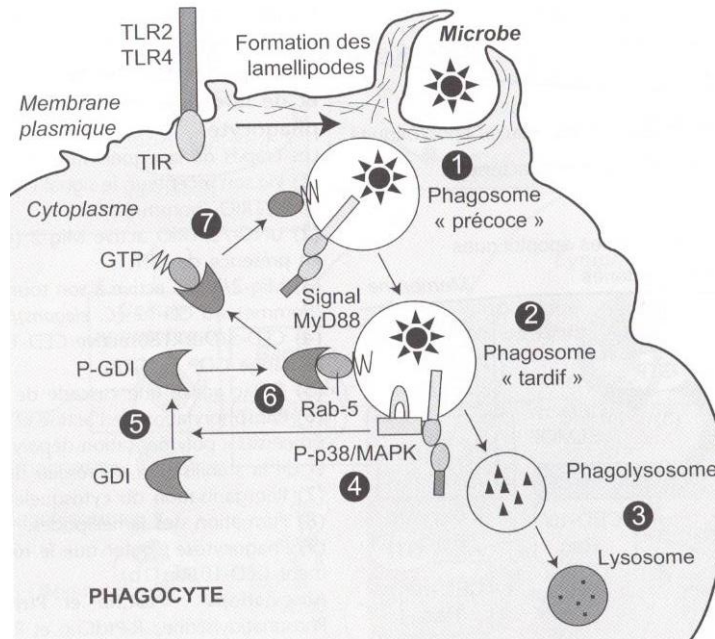
Chez les insectes, les cellules homologues des monocytes sont des hémocytes (Marmaras & Lampropoulou, 2009). Ils ont des activités diverses et leur fonction dépend du stade de développement de l'animal (Feldhaar & Gross, 2008). Chez la drosophile, les hémocytes se développent au stade embryonnaire et larvaire et sont présents à tous les stades du cycle biologique (Sampson et al., 2013). Alors qu'au stade larvaire et adulte, leur fonction principale peut être la phagocytose des pathogènes, ils sont aussi importants pour l'élimination des cellules apoptotiques ou des tissus dégénérés des embryons et des pupes (Feldhaar & Gross, 2008). Les hémocytes dominants chez la drosophile sont les plasmatoctes qui sont très mobiles et ressemblent aux macrophages humains (Feldhaar & Gross, 2008). Chez la drosophile, les hémocytes peuvent être divisés en plasmatoctes phagocytaires, cellules cristallines pour la mélanisation, et lamellocytes encapsulants (Honti et al., 2014). Les hémocytes d'insectes sont capables de changer leur état « non-adhérent » à « adhérent » lors de la reconnaissance des pathogènes et répondent par « diffusion » ce qui améliore la phagocytose des petits antigènes. Contrairement aux monocytes humains, les hémocytes d'insectes sont capables d'effectuer la nodulation et l'encapsulation de corps étrangers plus gros, comme les parasites (Negri et al., 2013). L'encapsulation est souvent suivie d'une mélanisation de l'antigène (Schmid et al., 2008). Les hémocytes sont également capables de sécréter des composés cytotoxiques dans la capsule (Negri et al., 2013). La mélanisation est un processus enzymatique utilisé dans la cicatrisation, l'immunité et le durcissement des cuticules des insectes (Hillyer, 2016). Comme les surfaces en verre et en plastique sont également reconnues comme non-soi, l'étalement sur ces surfaces est souvent utilisé comme mesure de l'aptitude immunitaire des hémocytes d'insectes (Negri et al., 2013).

### 2.2.2.2. *Phagocytose*

La phagocytose joue un rôle essentiel dans la défense immunitaire contre les bactéries, virus et petits parasites (Clos, 2012). La phagocytose est l'internalisation d'organismes étrangers relativement petits comme les bactéries, les levures ou les cellules apoptotiques par des cellules phagocytaires comme les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les neutrophiles (Feldhaar and Gross, 2008). La phagocytose est une réponse immunitaire rapide et les cellules peuvent phagocyter des centaines de bactéries à la fois (Hilliery 2016). Il s'agit d'une ancienne défense immunitaire évolutive puisqu'elle est également présente chez les invertébrés (Beutler, 2004).

Chez les insectes, les hémocytes peuvent être divisés en plusieurs sous-familles selon les perspectives morphologiques et fonctionnelles. Cependant, cette nomenclature n'est pas normalisée pour l'ensemble de la classe des insectes. Par exemple, les hémocytes phagocytaires sont des granulocytes de lépidoptères, d'hémiptères et de moustiques, et les plasmacytes de drosophile (Hilliery 2016). La phagocytose peut être réalisée par des hémocytes circulants et sessiles. Lors de la reconnaissance des pathogènes par les PAMP, la phagocytose est activée par des voies transcriptionnelles (cascades de protéines, Toll/TLR ou le JAK/STAT, voir chapitre 2.2.2.4 pour plus de détails). Dans le cas de l'élimination de matériel apoptotique, le signal « eat-me » pour activer la phagocytose est émis par PtdCho (Phosphatidylcholine) et PtdS (Phosphatidylsérine). Dès l'apparition du signal, la cellule phagocytaire commence à envelopper l'agent pathogène ou de la cellule apoptotique de sa membrane plasmique pour former des lamellipodes (Clos, 2012). Une fois que les lamellipodes ont entouré tout l'objet, le matériau phagocyté est encapsulé à l'intérieur du phagosome (Figure 4). Ces phagosomes sont des structures complexes de protéines dont 70 % ont des orthologues chez les insectes et les mammifères (Feldhaar et Gross 2008). Pendant la phagocytose précoce, le récepteur de reconnaissance est enfermé dans le phagosome prématuré et son domaine intracellulaire interagit avec la protéine myD88 provoquant la

maturation du phagosome et la fusion avec le lysosome pour former le phagolysosome, où les particules sont digérées par des enzymes hydrolytiques (Clos, 2012).



**Figure 4 : Formation du phagosome pendant la phagocytose (1). TLR2 ou 4 et son domaine intracellulaire TIR interagissent avec myD88 (2) provoquant la maturation du phagosome tardif et sa fusion avec le lysosome (3). L'interaction TIR/myD88 active également le complexe p38-MAPK (4) qui à son tour active l'inhibiteur de dissociation guanine-nucléotide (GDI) (5). Sa forme phosphorylée P-GDI (6) a une plus grande affinité avec la protéine Rab-5. Le complexe GDI-Rab-5 se fixe sur le phagosome précoce (7) et provoque le trafic vésiculaire du phagosome dans le cytoplasme (Clos, 2012).**

### 2.2.2.3. Branche humorale du système immunitaire inné

La capacité de phagocyter les microorganismes envahisseurs ne suffit pas à elle seule à éliminer avec succès les agresseurs. Les cellules d'invertébrés et de vertébrés sont capables de produire des peptides antimicrobiens pour augmenter leur résistance aux infections bactériennes (Schröder, 1999).

Après la détection d'antigènes par les PRR, leurs interactions avec les cytokines (Evans and Spivak, 2010) activent certaines des nombreuses voies de transcription comme Toll, Imd, JAK/STAT ou la voie JNK (Marmaras and Lampropoulou, 2009). Ces voies de transcription (protéines transmembranaires puis cascades de protéines) conduisent à la production de

facteurs de transcription qui peuvent pénétrer dans le noyau, où ils induisent la transcription de peptides antimicrobiens et autres effecteurs (Evans & Spivak, 2010). Les peptides antimicrobiens ainsi sécrétés peuvent interférer avec la paroi cellulaire du micro-organisme en formant des pores transmembranaires ou en la « dissolvant » comme un détergent (Li et al., 2012). Les perturbations structurelles ou les lésions métaboliques des microbes conduisent donc à leur destruction. La privation de nutriments, comme le fer, induite par certains petites microbiens est conduit par exemple à la destruction des microbes (Schröder, 1999). Plus de 200 de ces peptides ont été identifiés chez les insectes à ce jour (Li et al., 2012), dont le groupe des défensines qui est le plus courant chez les insectes et est également présent chez les mammifères (Beutler, 2004). Ces voies peuvent avoir des homologues chez les insectes comme dans le système immunitaire humain avec de légères différences quant aux protéines impliquées (Marmaras & Lampropoulou, 2009 ; Figure 5, 6 et 7).

#### 2.2.2.4. *Voies de signalisation*

Les signaux immunitaires, comme les PAMP ou les cytokines, se rattachent aux protéines transmembranaires et déclenchent une des nombreuses voies de transcription, comme Toll, Imd ou JAK/STAT. Ces voies de transcription sont des cascades de protéines de la paroi cellulaire vers le noyau qui initient la transcription des molécules de signalisation ou des peptides antimicrobiens et activent les réponses immunitaires. Les gènes et protéines orthologues de ces voies peuvent être trouvés chez les vertébrés et les invertébrés. Comme l'immunité innée a évolué très tôt, des similitudes peuvent être trouvées entre plusieurs phylums. Les différentes voies ont été spécialement étudiées dans l'organisme modèle *Drosophila melanogaster*, ce qui donne un bon aperçu de ces cascades de protéines chez d'autres espèces.

#### 2.2.2.4.1. Voie Toll et TLR

La voie Toll a d'abord été décrite chez la drosophile et est une voie de transcription très ancienne, présente dans les organismes pluricellulaires, les animaux et les plantes. Plusieurs composantes de cette voie ont aussi été trouvées chez des métazoaires primitifs suggérant qu'elle a son origine vers 450 millions d'années (Clos, 2012).

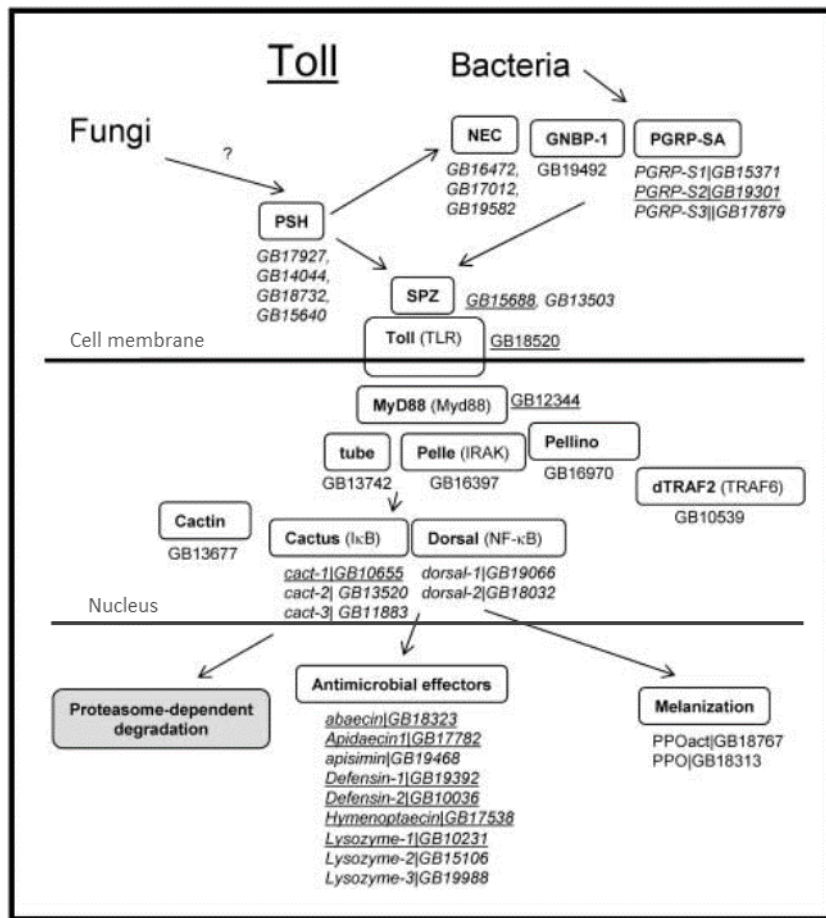
Chez la drosophile, les bactéries Gram-négatives ou les champignons initient une cascade de protéases à sérine menant à l'activation du Spätzle, le ligand du Toll (Welchman et al., 2009). Alors que chez la drosophile il y a neuf récepteurs de Toll codés dans son génome, il y a 5 récepteurs connus pour *Apis mellifera* (Hilliery 2016). Une fois activés par leurs ligands, ils initient la voie Toll, ce qui entraîne des cascades de protéines impliquant Myd88, Pelle (IRAK), Tube et autres (Figure 5). Cette transduction du signal conduit à son tour à l'activation du facteur NF-KB dorsal, entraînant la transcription des gènes effecteurs et des peptides antimicrobiens pendant la réponse immunitaire humorale (Valanne et al., 2011). Toll joue également un rôle dans la réponse immunitaire cellulaire et active la phagocytose et l'encapsulation des corps étrangers dans les insectes. Il est également connu pour contrôler la prolifération et la densité des hémocytes. Les mutations de son facteur NF-KB dorsal peuvent conduire à la formation de phénotypes tumoraux mélanoïdes.

Chez les vertébrés, l'homologue des récepteurs Toll est le récepteur TLR (Toll like receptor). Alors que chez les mammifères, la voie TLR n'est liée qu'aux réponses immunitaires, la voie Toll de la drosophile est impliquée non seulement dans les processus immunitaires mais aussi dans ceux du développement (Valanne et al., 2011).

Comme chez les insectes, le NF-KB chez les mammifères est un régulateur des gènes contrôlant la prolifération cellulaire. Une mauvaise régulation peut mener à plusieurs maladies et aussi à l'inflammation. Souvent mal régulé dans les cellules tumorales, il favorise la prolifération cellulaire (Sansone and Bromberg, 2012). Le NF-KB n'est pas seulement activé par la voie Toll/TLR, mais aussi par Imd et JNK chez les insectes, ou par la voie du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) chez les mammifères (Bonizzi and Karin, 2004). On peut



noter que l'inhibition du NF-KB s'est déjà révélée efficace dans le traitement du cancer (Sansone and Bromberg, 2012).



**Figure 5 : Signalisation de la voie de Toll pour les orthologues drosophiles et vertébrés (entre parenthèses). Les correspondances de gènes d'abeille sont montrées ci-dessous. Les gènes soulignés ont montré une régulation accrue de la transcription après un défi immunitaire (Evans et al. 2006).**

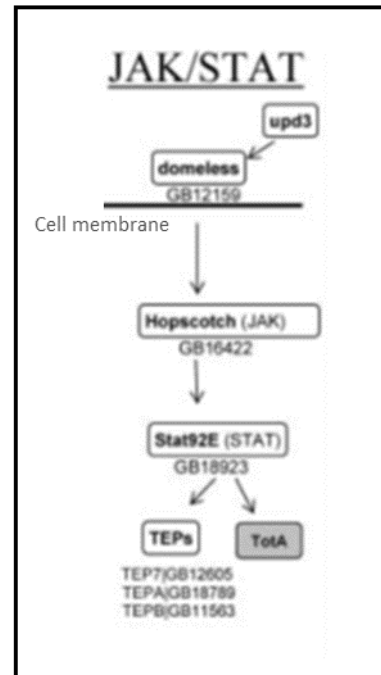
#### 2.2.2.4.2. Voie JAK/STAT

La voie de Janus kinase/ transducteur du signal et activateur de transcription (JAK/STAT) est associée à l'activation des neutrophiles et des macrophages, au contrôle des réponses inflammatoires et de la guérison des plaies (Myllymäki and Rämet, 2014). Elle est activée par un certain nombre de cytokines qui se lient à leurs nombreux récepteurs activant la phosphorylation du facteur de transcription STAT par la kinase JAK (Welchman et al., 2009). JAK/STAT se retrouve chez les invertébrés comme chez les vertébrés avec des modifications

des protéines impliquées, comme le hopscotch et le Stat92E chez la drosophile à place du JAK et du STAT chez les vertébrés (Figure 6). Chez les mammifères, il joue un rôle dans la différenciation des lymphocytes T et B dans le système immunitaire adaptatif. Chez la drosophile, la cytokine « Unpaired » (Upd) se fixe sur le récepteur « domeless » (Figure 6). Chez les mammifères, les cytokines comme IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 et bien d'autres se fixent sur leurs nombreux récepteurs (Schindler et al., 2007). Par conséquent,

chez l'homme, la voie est plutôt complexe car elle peut être activée par de nombreuses cytokines différentes et les JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) et les STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6) peuvent former des homo et hétérodimères, s'associer à de multiples facteurs et coacteurs de transcription (Myllymäki and Rämetsä, 2014). JAK/STAT est activé en réponse au stress ou aux blessures et joue également un rôle dans le recrutement d'hémocytes ou de monocytes pour combattre les tumeurs et les blessures épithéliales (Welchman et al., 2009). En réponse aux tumeurs, l'expression de certaines cytokines est

régulée à la hausse, ce qui entraîne l'activation de la voie JAK/STAT et améliore ainsi la prolifération cellulaire pour réduire la croissance de la tumeur (Vanha-aho et al., 2016). La voie de signalisation JAK/STAT contribue également à d'autres réponses immunitaires comme les infections virales puisque la production de ses cytokines de signalisation est induite par d'autres voies de signalisation (Myllymäki and Rämetsä, 2014).



**Figure 6 : La voie de JAK/STAT chez la drosophile, montrant des orthologues vertébrés entre parenthèses et des gènes d'abeilles mellifères en dessous (selon Evans et al. 2006).**

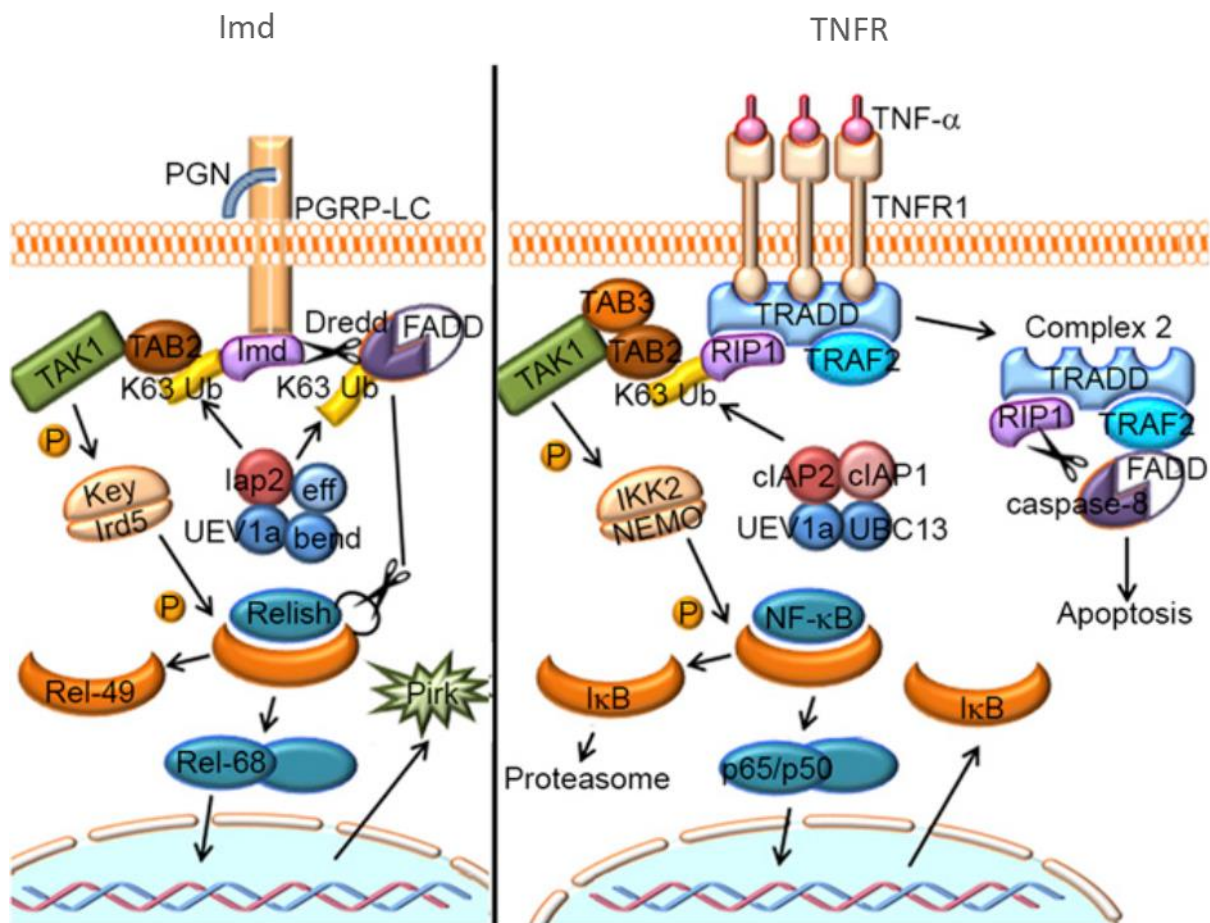
#### 2.2.2.4.3. Voie Imd et TNFR

La voie de l'immunodéficiencia (Imd) chez les insectes (Figure 7) est activée par les protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP) qui se lient aux peptidoglycanes bactériens (Evans et al., 2006). Bien que les insectes aient plusieurs familles de PGRP, les mammifères n'en ont que quatre, dont certains fonctionnent aussi comme protéines bactéricides. Jusqu'à présent, aucune fonction de signalisation par ces protéines n'est connue chez les mammifères (Myllymäki et al., 2014). Il existe 19 PGRP connus chez la drosophile, dont certains affectent positivement ou négativement la voie d'Imd et 4 PGRP chez l'abeille. La voie Imd est très bien préservée dans l'abeille mellifère avec des nombreux orthologues avec la drosophile pour tous les composants (Evans et al., 2006). Une fois activée, la voie Imd conduit à l'activation du NF- $\kappa$ B en régulant l'activité du facteur NF- $\kappa$ B Relish. Imd détecte principalement, mais pas seulement, les bactéries Gram-négatives et est également impliqué dans la réponse immunitaire antivirale de la drosophile (Costa et al., 2009).

Imd est clivé par la caspase Dredd, ce qui lui permet de s'associer à la ligase E3 Diap2, résultant en une polyubiquitination de K63. Ceci conduit au clivage et à la phosphorylation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B Relish. Relish entre ensuite dans le noyau, ce qui conduit à la transcription des peptides antimicrobiens (AMP) (Welchman et al., 2009). Étant donné qu'elle contrôle l'expression de la plupart des PMA chez les insectes, La voie d'Imd joue un rôle important dans la réponse immunitaire (Kaneko et al., 2004).

Chez les mammifères, l'homologue de la voie Imd est la voie TNFR (Figure 7), bien qu'Imd présente également certaines similitudes avec la voie TLR. Le TNFR est initié par des cytokines comme le TNF- $\alpha$ . Il y a plusieurs récepteurs différents qui déclenchent la voie de signalisation. L'activation d'un seul groupe de récepteurs entraîne le recrutement de domaines de mort intracellulaire tels que le domaine de mort associé au FAS (FADD) et le domaine de mort associé au TNFR (TRADD). Ces molécules activent la cascade caspase et conduisent à l'apoptose (Hehlgans and Pfeffer, 2005). L'activation du récepteur TNFR1 peut conduire soit à l'apoptose, soit, lorsque la synthèse protéique est bloquée, à l'activation et à la transcription des gènes inflammatoires par activation de NF- $\kappa$ B (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Le NF- $\kappa$ B est activé par phosphorylation de sa protéine inhibitrice I $\kappa$ B par le complexe I $\kappa$ B kinase (IKK), qui

est dégradé, et le NF- $\kappa$ B est libéré (Myllymäki et al., 2014). Comme I $\kappa$ B est également l'un des gènes cible du NF- $\kappa$ B, il crée une boucle de rétroaction négative et constitue un mécanisme de régulation majeur pour cette voie de signalisation. Chez la drosophile, ce mécanisme ne se produit pas car le facteur NF- $\kappa$ B Relish lui-même contient de l'I $\kappa$ B. Ainsi, chez la drosophile, la voie Imd est régulée par l'induction rapide d'un gène appelé *pirk*, qui interagit avec les récepteurs PGRP et interrompt la transduction du signal (Myllymäki et al., 2014).



**Figure 7 : Voie de signalisation Imd de la drosophile et de la TNFR humaine. Les composants conservés sont indiqués par des formes et des couleurs similaires. Bend, bendless; eff, effete; Key, Kenny; K63 Ub, K63 polyubiquitination; NEMO, NF- $\kappa$ B essential modulator; TAB, TAK1-binding protein; TRADD, TNFR1-associated death domain (Myllymäki et al., 2014).**

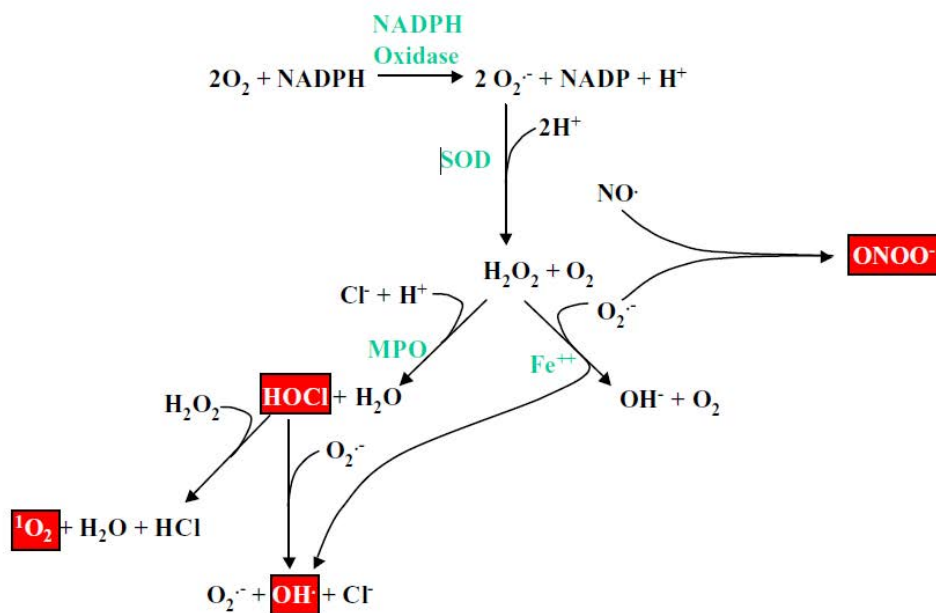
### 2.2.2.5. *Espèces réactives de l'oxygène*

Lors de l'activation immunitaire, les cellules immunitaires sécrètent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) afin de désactiver les microbes. Ce sont surtout les cellules phagocytaires comme les macrophages qui produisent des ROS pour tuer les microbes internalisés, mais aussi les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles qui en sont capables (Halliwell, 1991). La production de radicaux oxygène est initiée par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH), un complexe enzymatique qui crée du superoxyde ( $O_2^-$ ; Figure 8; (Beutler, 2004). Le superoxyde lui-même n'est pas un radical mais est transformé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui est transformé en halogénures réactifs (HOCl), oxygène singulet ( $^1O_2$ ) et radicaux hydroxyles ( $OH^*$ ), qui sont tous fortement microbicides. Le superoxyde forme également des radicaux d'azote en combinaison avec l'oxyde nitrique (NO) et l'ozone en combinaison avec l'eau (Beutler, 2004).

Comme ces espèces d'oxygène sont aussi très toxiques pour les cellules elles-mêmes, elles sont neutralisées par la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme qui élimine les superoxydes radicalaire (Halliwell, 1991). Même si ce système n'est pas parfait, il représente un bénéfice important pour l'immunité de l'hôte (Beutler, 2004) bien que les concentrations bénéfiques se situent à des niveaux faibles et modérés de ROS et d'oxyde nitrique synthase (NOS; Poprac et al., 2017).

En cas de déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées et l'élimination enzymatique, l'organisme est exposé au stress oxydatif (Poprac et al., 2017). Les ROS ne sont pas seulement produites lors d'une réponse immunitaire, mais elles peuvent aussi être le résultat de radiations, de rayons ultraviolets, de fumée de cigarette, de pollution atmosphérique et autres polluants chimiques (Korayem et al., 2012). En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de la production de ROS dans les cellules phagocytaires humaines après exposition à des polluants chimiques (Baulig et al., 2003; Klestadt et al., 2002; Qin, 2012). Le stress oxydatif jouerait un certain rôle dans le cancer, les maladies liées au stress (Poprac et al., 2017), les pathologies neurodégénératives, le vieillissement et la maladie d'Alzheimer (Peña-Bautista et al., 2019).

Par rapport à l'homme, les insectes sont exposés à des charges croissantes de stress oxydatif car leur système respiratoire délivre de l'oxygène directement à leurs tissus par diffusion gazeuse à travers leur trachée. En même temps, ces tissus ont un grand besoin d'oxygène lors du vol. D'autres insectes se nourrissant de plantes pourraient être exposés à des composés pro-oxydants présents dans leur alimentation, ce qui pourrait augmenter la charge normale de stress oxydatif (Korayem et al., 2012). Les insectes pollinisateurs comme les abeilles ou les bourdons se nourrissent de nectar, de pollen et de propolis qui contiennent des substances allélochimiques, molécules libérées par un organisme pour influencer la physiologie, la croissance, le comportement ou le cycle biologique d'un autre organisme (Gross, 2009). Dans les plantes, les produits allélochimiques affectent les herbivores ou les agents pathogènes en cas de dégâts et produisent des ROS et des NOS chez les abeilles. Les abeilles ont donc développé un système enzymatique antioxydant très efficace pour éliminer les radicaux libres d'oxygène (Korayem et al., 2012).



**Figure 8 : Complexe enzymatique produisant des molécules microbicides dans les macrophages. Les enzymes sont indiquées en vert ; les cases rouges indiquent les espèces qui sont toxiques pour les microbes (Beutler et al., 2004).**

Lors de la réponse immunitaire des insectes, NO joue un rôle important contre les virus, les bactéries et les parasites et est produit sous forme de molécule immunitaire effectrice fonctionnant à la fois comme molécule de signalisation et comme composant cytotoxique (Rivero, 2006). Il a été démontré que NO joue un rôle majeur dans le début de l'activation immunitaire des hémocytes d'abeilles mellifères lors de la non-identification et de la propagation des hémocytes (Negri et al., 2013). De plus, il s'agit d'une réponse non spécifique omniprésente contre presque tous les pathogènes tuant ceux-ci et qui est par conséquent, pertinente dans le processus de la phagocytose. Bien que NO agisse comme inducteur de la réponse immunitaire dans les phagocytes, il peut provoquer l'apoptose dans les cellules voisines par la production de quantités importantes par les hémocytes.

#### 2.2.2.6. *Cytokines*

Les cytokines sont un groupe de peptides messagers solubles de faible poids moléculaire et de protéines ayant des fonctions immunomodulatrices qui sont sécrétées par les cellules immunitaires (DeFilippo et Beck, 2018). Les cytokines sont un groupe de peptides messagers et de protéines solubles de faible poids moléculaire ayant des fonctions immunomodulatrices qui sont sécrétées par les cellules immunitaires (DeFilippo et Beck, 2018). Chez l'homme, les cytokines impliquées dans les réactions immunitaires sont des protéines qui sont habituellement sécrétées par des cellules de la lignée cellulaire hématopoïétique (Shearer et al., 2003). Les cytokines sont produites et sécrétées par les cellules immunitaires afin de stimuler et d'activer le comportement d'autres cellules immunitaires, mais elles n'ont aucun effet direct sur les microbes eux-mêmes (Beutler, 2004). Elles sont pléiotropes, ce qui signifie qu'une cytokine peut affecter plusieurs types de cellules différents et entraîne donc une grande variété de réponses biologiques puisque chaque type de cellule remplit une autre fonction. En même temps, différents types de cytokines peuvent évoquer exactement la même réponse lorsqu'elles agissent sur une seule cellule ciblée (Geijsen et al., 2001). Les cytokines peuvent être classées en sous-familles en fonction de leurs caractéristiques

structurelles, comme le faisceau 4- $\alpha$ -hélicoïdal à chaîne courte ou longue et leurs différents récepteurs (Shearer et al., 2003).

Les premières cytokines excrétées pendant la réponse immunitaire sont les facteurs de stimulation des colonies (CSF, Chantry et al., 1990). L'un de ces CSF est le facteur de stimulant des colonies de granulocytes et des macrophages (GM-CSF, Metcalf, 1986). Le GM-CSF affecte principalement les cellules neutrophiles et les monocytes, améliore la survie, la prolifération et la différenciation et l'activation fonctionnelle de ces cellules (McCormack and Gonda, 1997).

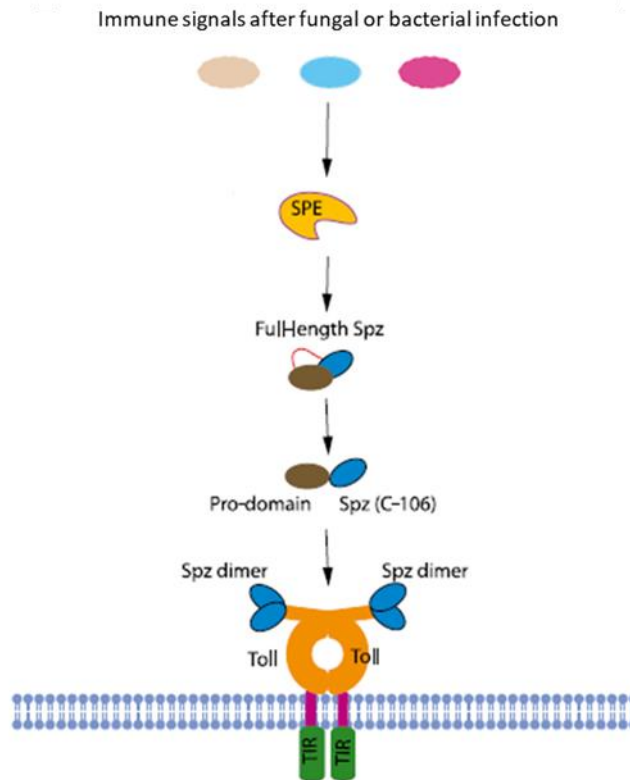
D'autres cytokines importantes pendant la réponse immunitaire sont les interleukines. L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire qui stimule la sécrétion de protéines pendant la phase aiguë de l'inflammation. Elle peut différencier d'autres cellules et est un messenger entre les cellules pendant l'inflammation.

Une autre cytokine importante pendant la réponse immunitaire est le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ). Elle joue un rôle important dans l'inflammation systémique et est responsable de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de l'apoptose cellulaire (Hehlgans and Pfeffer, 2005). Elle provoque de la fièvre et est caractéristique de la réaction immunitaire en phase aiguë. Le dysfonctionnement de ces cytokines peut avoir des effets néfastes sur l'homéostasie de la réponse immunitaire. Plusieurs maladies comme la maladie d'Alzheimer (Swardfager et al., 2010), le cancer (Locksley et al., 2001) ou des maladies auto-immunes comme le psoriasis (Victor and Gottlieb, 2002) ont été liées à une dérégulation des cytokines.

Alors que les cytokines ont été bien étudiées chez les mammifères, les connaissances sur les cytokines d'insectes sont assez limitées. La définition de « cytokine » chez les insectes n'est pas très claire, bien que plusieurs cytokines ou facteurs de type cytokine aient été signalés chez les insectes (Matsumoto et al., 2012).

Les peptides bloquant la croissance (GBP) sont une famille de cytokines que l'on trouve chez plusieurs espèces de lépidoptères mais aussi chez certains diptères. Ils ont des fonctions différentes allant de la régulation de la croissance au contrôle de l'immunité (Matsumoto et al., 2012).





**Figure 9 : Signalisation Spätzle dans la voie Toll de la drosophile. SPE (Spätzle processing enzyme) expose la région C-terminale active sur Spaetzle, qui est couverte par le domaine pro. La SPE n'agit qu'en présence d'agents pathogènes. Le Spätzle, maintenant actif, se lie alors aux récepteurs de Toll (après Valanne et al., 2011).**

Contrairement aux vertébrés, aucun interféron ou protéine de type interleukine n'est connu chez la drosophile. Les interleukines et les interférons activent la voie de transcription JAK/STAT chez les vertébrés. Chez la drosophile, les molécules de type cytokine « Unpaired » (Upd 1, Upd 2 et Upd 3) sont connues pour activer la voie JAK/STAT et pourraient être considérées comme des homologues des cytokines mammifères de type 1 (Vanha-aho et al., 2016). Après une exposition bactérienne ou une infection virale, Upd3 et Upd2 sont sécrétés par les hémocytes pour activer la prolifération cellulaire. Ils se fixent sur le récepteur « domeless » pour déclencher la cascade des protéines de JAK/STAT.

Outre les Upds, Spätzle est une autre cytokine que l'on trouve chez la drosophile et les abeilles mellifères. Spätzle est produit et sécrété sous forme de protéine inactive. Spätzle n'est activé que pendant une réponse immunitaire par l'enzyme de traitement Spätzle (SPE), qui fixe le prodomaine couvrant la région C-terminale active de la molécule (Figure 9). La région C-

terminale exposée de Spätzle se lie alors au récepteur Toll activant la voie Toll (Vanha-oha et al., 2016).

Chez la drosophile. la cytokine Eiger est un homologue de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF, Kauppila et al., 2003). Eiger active la voie JNK et déclenche l'apoptose. Elle joue un rôle important dans le contrôle de la croissance tumorale, la prolifération cellulaire et son expression est induite par plusieurs stimuli immunitaires (Vanha-oha et al., 2016).

### 2.3. Objectif

Au cours des dernières années, les insectes pollinisateurs, en particulier les abeilles, ont été la cible principale de nombreuses études mondiales relatives à l'effondrement soudain des colonies (Neumann and Carreck, 2010). Ces pertes ont été associées à l'exposition combinée des pesticides et des infections par des pathogènes comme les virus, les bactéries et les champignons (Pettis et al., 2012; Vidau et al., 2011). Les insectes dépendent de leur système immunitaire inné dans la défense contre des agents pathogènes une fois que les barrières de protection externes ont été franchies. Les hémocytes jouent donc un rôle clé dans la défense infectieuse. Même si les abeilles ont été les plus étudiées du fait du rôle économique, ce sont en fait, l'ensemble des insectes pollinisateurs qui sont affectés par ce phénomène entraînant une perte de biodiversité et un risque pour la reproduction des végétaux (Potts et al., 2010). Les pesticides affectent également l'Homme : les résidus, ou métabolites, de ces pesticides se retrouvent ainsi dans notre alimentation et notre environnement (Hörtig, 1993).

L'objectif de cette thèse est donc de comparer la cytotoxicité de l'imidaclopride, un insecticide néonicotinoïde, et de sa formulation commerciale « le Confidor vert », sur les cellules du système immunitaire d'insectes pollinisateurs (*Apis mellifera* et *Bombus terrestris*) comparées aux cellules immunitaires d'insectes et de vertébrés, *Drosophila melanogaster* et l'Homme servant de modèles expérimentaux sous influence d'une activation microbienne.

Le questionnement scientifique visera à enrichir les connaissances quant aux relations qui peuvent exister entre l'interaction des pesticides directement avec les cellules du système immunitaire conduisant à une réponse immunitaire désorganisée de l'organisme hôte et donc à un impact plus important des pathogènes.

Les cellules seront exposées à l'imidaclopride et son produit commercial « le Confidor vert ». Après avoir examiné la réactivité cellulaire directement après l'exposition à ces polluants chimiques, on s'intéressera à la réactivité cellulaire des cellules soumises au stress combiné du pesticide (molécule active et formulation commerciale) et de pathogène induit par les *lipopolysaccharides* (LPS) bactériens, qui agissent en tant que PAMP pour simuler une réaction immunitaire.



# **MATERIELS ET METHODES**



### 3. MATERIELS ET METHODES

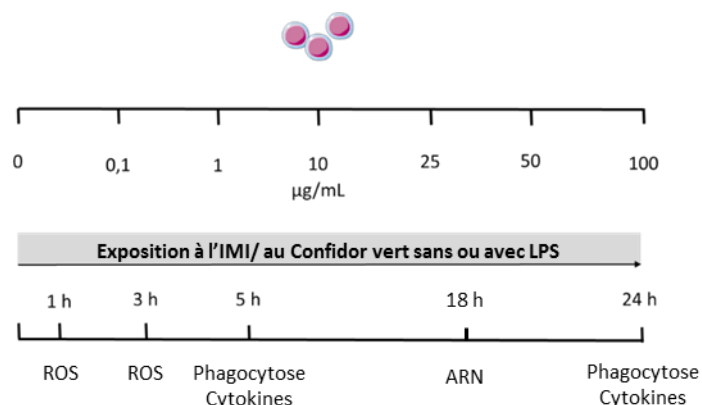
#### 3.1. Démarche scientifique

Pour étudier l'effet des pesticides sur l'activité des cellules de type « macrophage » appartenant à quatre espèces différentes, l'abeille (*Apis mellifera*) et le bourdon (*Bombus terrestris*) en primocultures, la drosophile (*Drosophila melanogaster*, Schneider 2) et l'Homme (THP-1), la réactivité immunitaire en présence de six concentrations différentes (0,1 ; 1 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL) d'Imidaclopride (« Task 1 ») et de sa formulation commerciale le Confidor vert (« Task 2 »), est testée après vérification de l'absence d'effet toxique aiguë (Figure 10). L'imidaclopride sera utilisé comme insecticide car il est le plus fréquemment détecté dans les charges polliniques du centre de la France (Chauzat et al., 2011). Pour étudier la réactivité des cellules exposées aux pesticides et à des agents pathogènes, les cellules sont traitées simultanément à l'imidaclopride avec des LPS (lipopolysaccharide) d'*Escherichia coli*, qui agissent en tant que PAMP (pathogen-associated molecular pattern) pour simuler une réaction immunitaire. Les LPS, composés d'une endotoxine et d'un composant de la membrane externe des bactéries Gram-négatives, induisent une réponse inflammatoire du système immunitaire (Tafalla et al., 2003; Tauszig et al., 2000). Les LPS interagissent avec diverses cellules hôtes, mais surtout avec des macrophages / monocytes conduisant à la production d'espèces réactives d'oxygène et diverses cytokines comme la TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 et IL-10 (Rietschel et al., 1994). Le temps d'exposition varie en fonction de la réactivité



**Figure 10 : Schéma du projet. L'exposition des cellules humaines, drosophiles, abeilles et bourdons à l'imidaclopride, son produit commercial (CONFIDOR vert) et l'exposition simultanée aux pesticides et aux LPS, utilisés comme agent pathogène.**

cellulaire examinée (Figure 11). Lorsqu'elles sont exposées aux LPS, les cellules sont exposées simultanément aux pesticides.



**Figure 11 : Exposition des cellules aux différentes concentrations de pesticides.**

Travaillant avec différentes espèces, il apparait que le dosage de la réactivité diffère selon les cellules. Certaines réactivités cellulaires sont quand même communes et sont dosées de la même façon quel que soit l'organisme. Parmi ces dernières, on trouve la viabilité cellulaire, la phagocytose et la production de ROS (Espèces réactives de l'oxygène) dont, plus particulièrement, la synthèse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO.

Le marqueur cellulaire examiné, comme la production de cytokines spécifiques et l'expression de protéines, dépend de la cellule testée. Afin de comparer les réactivités cellulaires entre les différentes espèces, des homologues de cytokines et de protéines ont été choisis. Si aucun homologue direct n'a été trouvé, nous avons choisi des protéines ou des cytokines qui représentent les mêmes voies de signalisation (JAK / STAT, Imd, JNK ou Toll) (Tableau 1).

**Tableau 1 : Paramètres cellulaires représentant les mêmes voies de transcriptions**

Voie de transcription	vertébré/ THP1	<i>Drosophila/S2</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Bombus terrestris</i>
JNK	TNF-alpha	Eiger	basket	basket
JAK/STAT	IL-6	Upd 3	TEPA	TEPA
IMD	NF-kappa β	relish	relish	relish
		dorsal	dorsal	dorsal
TOLL	IL-17	Spaetzle	Spaetzle	TOLL
		myD88	myd88	myd88
		défensine	défensine	défensine



## 3.2. Culture cellulaire

### 3.2.1. Monocytes/macrophages humains : lignée cellulaire THP- 1

Les THP-1 (Figure 12) sont dérivées du sang d'un patient âgé d'un an atteint de leucémie monocyttaire aiguë (Qin, 2012). La morphologie des cellules ressemble à celle des cellules de la leucémie monocyttaire avant la culture *in vitro*. Les cellules ont un diamètre d'environ 12 à 14  $\mu\text{m}$  (Tsuchiya et al., 1980). Elles ont été achetées auprès de Leibnitz - Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Réf. ACC 16). Les cellules sont stockées en phase vapeur d'azote liquide (entre  $-135^{\circ}\text{C}$  et  $-190^{\circ}\text{C}$ ) avec 70% de milieu de congélation, 20% de FBS (sérum de veau fœtal) et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde) à environ  $5 \times 10^6$  cellules /mL. Le DMSO est utilisé comme cryoprotecteur pendant la procédure de congélation pour réduire le risque de formation de cristaux de glace et pour empêcher ainsi la lyse des cellules (Mazur, 1984). Après décongélation d'un millilitre de cellules au bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$ , la suspension de cellules est diluée dans 10 mL de milieu de congélation afin de diluer immédiatement le DMSO, qui est toxique pour les cellules après décongélation.

Le milieu de décongélation des THP-1 est composé de :

- RPMI 1640
- + 20 % de FBS (sérum de veau fœtal) inactivé à la chaleur
- + 2 mM de L-Glutamine
- + 50 U/mL de pénicilline
- + 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de streptomycine

La solution est ensuite centrifugée à  $160 \times g$  pendant 5 minutes et les surnageants sont éliminés afin de nettoyer complètement les cellules du DMSO.

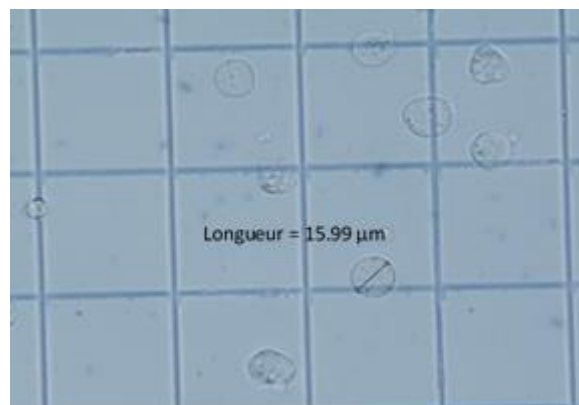
Les cellules sont remises en suspension dans 5 mL du milieu de congélation et versées dans un flacon de culture de  $25 \text{ cm}^2$ . Les cellules sont maintenues à l'obscurité dans un incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  et 5% de  $\text{CO}_2$ .

Après une semaine, les cellules sont nourries avec 5 mL supplémentaires de milieu de congélation et conservées dans un incubateur pendant une autre semaine. Après les deux premières semaines, les cellules reprennent leur croissance normale. Le milieu est ensuite changé tous les 4 jours avec du milieu de culture et les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour entretenir la culture, les cellules sont récoltées à environ 1 x 10<sup>6</sup> cellules / mL etensemencées à 0,4 à 0,5 x 10<sup>6</sup> cellules / mL.

Les cultures de THP-1 ont été testées pour le Mycoplasma avec un kit de détection MycoAlert™ Mycoplasma de Lonza.

Le milieu de culture des THP-1 est composé de :

- RPMI 1640
- + 10 % de FBS (sérum de veau foetal) inactivé à la chaleur
- + 2 mM de L-Glutamine
- + 50 U/mL de pénicilline
- + 50 µg/mL de streptomycine



**Figure 12 : THP-1 d'un humain âgé d'un an atteint de leucémie monocyttaire aiguë dans un hémocytomètre de Malassez, longueur mesurée par le logiciel d'imagerie NIS-Elements BR 3.10.**

### 3.2.2. Hémocytes de drosophile : lignée cellulaire Schneider 2

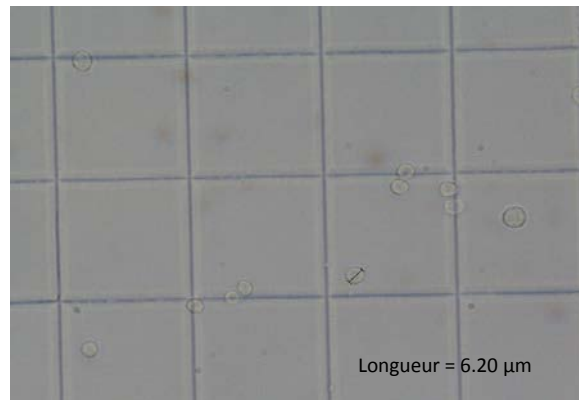
La lignée cellulaire Schneider a été établie à partir d'un embryon tardif d'une *Drosophila melanogaster* (mouche des fruits) en 1972 (Schneider, 1972). Les Schneider 2 (Figure 13) ont été achetées auprès de Leibnitz - Institute DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Réf. ACC 130).

Les cellules sont stockées dans une phase vapeur d'azote liquide (entre -135°C et -190°C) dans un milieu de congélation composé de 35% de milieu d'insecte Schneider, 35% de milieu d'insecte TC-100, 20% de FBS et 10% de DMSO à environ  $5 \times 10^6$  cellules / mL. La procédure de décongélation est comparable à celle des THP-1 décrite ci-dessus avec de légères modifications concernant les températures et les milieux utilisés.

Après décongélation des cellules au bain-marie à 20°C, la suspension de cellules est diluée dans 10 mL de milieu de congélation. La solution est ensuite centrifugée à 500 x g pendant 5 minutes et les surnageants sont éliminés. Les cellules sont remises en suspension dans 5 mL du milieu de départ et versées dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont conservées dans un incubateur à 20°C sans addition de CO<sub>2</sub>. Le couvercle du flacon est maintenu fermé afin d'éviter les échanges de gaz avec l'atmosphère extérieure. Après une semaine, les cellules sont nourries avec 5 mL supplémentaires de milieu de congélation. Après les deux premières semaines, les cellules retrouvent une croissance normale. Le milieu de culture est remplacé deux fois par semaine avec un nouveau milieu de culture. Les cellules adhérentes sont remises en suspension dans le flacon grâce à une spatule en caoutchouc et le volume requis de cellules est retiré du flacon. Après centrifugation à 500 x g pendant cinq minutes, le culot est récupéré et les cellules sont remises en suspension dans un nouveau milieu de culture puis déposées dans un nouveau flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Les cellules sont récoltées à environ 15 à 20 x 10<sup>6</sup> cellules / 25 cm<sup>2</sup> etensemencées à environ 1 à 2 x 10<sup>6</sup> dans un flacon de 25 cm<sup>2</sup>.

Le milieu de culture des Schneider 2 est composé de :

- + 44,75% milieu d'insecte de Schneider
- + 44,75% milieu d'insectes TC-100
- 10% de FBS (sérum de veau foetal) inactivé par la chaleur
- + 50 U/mL de pénicilline
- 50 µg/mL de streptomycine



**Figure 13 : Schneider 2 de *Drosophila melanogaster* dans un hémocytomètre de Malassez. Longueur mesurée avec le logiciel d'imagerie NIS-Elements BR 3.10**

-

### 3.2.3. Hémocytes d'abeilles et de bourdons

Les hémocytes des abeilles (*Apis mellifera*, Figure 16) et des bourdons (*Bombus terrestris*) ne peuvent pas être maintenus en lignées cellulaires continues (Goblirsch et al., 2013). Par conséquent, les cellules sont directement extraites des larves d'abeilles ou de bourdon au dernier stade larvaire.

Les larves d'abeilles (*Apis mellifera*) proviennent de différentes colonies hébergées sur un site urbain (Metz, Lorraine, France), un site rural (Haironville, Lorraine, France), sur le site de l'IUT de Thionville-Yutz (espace boisé) et le site du CETAM (Centre d'Études Techniques Apicoles de Moselle, Lorraine). Après collecte, les gaufres sont incubées à 25°C et 65% d'humidité pendant la nuit avant extraction des larves. Quatorze boîtes de bourdons Natupol excel (*Bombus terrestris*) ont été achetées chez Koppert France S.A.R.L. et placées dans un jardin à l'abri du

soleil et de la pluie ou installées dans des serres sans utilisations de pesticides. Les larves de bourdons sont collectées immédiatement avant les essais (Figure 14).

L'hémolymphe est extraite des larves du cinquième stade en perçant la cuticule molle avec une aiguille stérile et en recueillant la goutte obtenue avec une micropipette (Negri et al., 2014). 25  $\mu$ L sont prélevés sur les larves d'abeilles et 40  $\mu$ L sur les larves de bourdons. L'hémolymphe est immédiatement diluée dans du milieu PBS (solution saline tamponnée au phosphate) ou dans du milieu WH-2, cependant de type d'essai réalisé. Le milieu WH-2 est préparé suivant la description de Hunter (2010) puis stérilisé par filtration.

Le milieu WH-2 est composé de :

- Milieu d'insecte Schneider	150 mL
- Solution de 0.06 M <sub>L</sub> -histidine (pH 6,35)	200 mL
- FBS (sérum de veau fœtal) inactivé par la chaleur	50 mL
- CMRL 1066	15 mL
- Hanks' Salts	5 mL
- Milieu d'insecte supplémentaire (10x)	2 mL
- Gentamicine, unité/1 $\mu$ L/mL	1 $\mu$ L/mL



**Figure 14:** À l'intérieur d'une ruche de bourdons (A) avec des cocons de nymphes (flèches blanches) et des ouvrières qui s'occupent des larves (flèches noires). B) cadre avec différents stades de développement des larves d'abeilles. C) Larves et nymphes de bourdons à différents stades de développement.

### 3.3. Exposition cellulaire

#### 3.3.1. Exposition à l'imidaclopride et son produit commercial

Selon les essais, l'imidaclopride (37894 Sigma-Aldrich, étalon analytique en poudre), en tant que molécule mère, est dissoute soit dans le milieu de culture de chaque type de cellule, soit dans du PBS (pH 7,4) à 300 µg / mL. La solution mère d'imidaclopride est ensuite diluée dans du PBS ou du milieu de culture afin d'obtenir les concentrations suivantes : 0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 µg / mL. Ces concentrations ont été choisies en fonction de la littérature. Bal et al. (2010) et Benzidane et al. (2011) ont utilisé des concentrations de 0,25 µg/mL à 250 µg/mL dans des expositions *in vitro* de cellules neuronales (vertébrées et invertébrées) à IMI. Benzidane et ses collaborateurs (2011) ont constaté que l'IMI a un impact négatif sur la viabilité cellulaire des cellules neuronales de Kenyon des blattes à 12,75 µg/mL après 8 h d'exposition. Comme l'IMI est un agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, nous avons supposé que l'impact de l'IMI sur les cellules neuronales devrait être plus fort que sur les cellules immunitaires. Comme l'exposition des cellules à l'IMI ayant été effectuée *in vitro*, les processus de désintoxication de l'organisme sont absents du processus expérimental. Or, les métabolites de l'IMI pourraient jouer un rôle plus important sur la toxicité chronique que sur la toxicité aiguë des hémocytes d'abeilles. Nous avons donc choisi d'ajouter des concentrations plus élevées que celles qui sont usuelles dans l'environnement, car nous voulions tester une toxicité plutôt aiguë que chronique au travers d'un modèle *in vitro*.

La formule commerciale de l'imidaclopride, appelée « Confidor vert » (200 g d'imidaclopride/L), est diluée une première fois à 400 µg/mL dans du PBS ou du milieu de culture puis dilué une seconde fois pour obtenir les concentrations susmentionnées. Les cellules sont incubées avec les sept concentrations d'imidaclopride retenues pendant 1, 3, 5 ou 24 heures selon les paramètres testés. L'incubation est effectuée à l'obscurité, l'imidaclopride étant photodégradable (Gervais et al., 2010), dans les conditions de culture requises pour chaque type de cellule (voir points 3.2.1 à 3.2.3).

Au cours de chaque essai, toutes les surnageants cellulaires sont testées par HPLC (high performance liquid chromatography) pour déterminer la concentration réelle d'imidaclopride réellement en contact avec les cellules. Une solution standard d'imidaclopride pour analyse (46341 Sigma-Aldrich) diluée à 100 µg / mL dans de l'acétonitrile est utilisée pour le dosage.

### 3.3.2. Différentiation des THP-1 en macrophages

Pour augmenter la détection des réponses immunitaires des THP-1 à des stimuli immunitaires faibles, les THP-1 sont différenciées en macrophages. Les THP-1 sont cultivées dans le milieu de culture supplémenté avec 5 ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) pendant 48 heures avant les essais (Park et al., 2007). Les cellules différenciées adhèrent à leur surface de montage : les cellules destinées aux tests de phagocytose ont été incubées sur des lamelles de verre. Après 48 heures, les cellules sont lavées avec du PBS avant d'être utilisé pour les expériences auxquelles elles sont destinées.

### 3.3.3. Activation immunitaire par les LPS

Pour activer la réponse immunitaire, les cellules sont traitées avec des LPS (*lipopolysaccharides*) d'*Escherichia coli*. Les LPS interagissent avec diverses cellules hôtes, mais surtout avec les macrophages / monocytes, ce qui conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de diverses cytokines telles que le TNF-α, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 (Rietschel et al., 1994).

L'activation par les LPS est réalisée en même temps que l'exposition à l'imidaclopride et au Confidor vert. Les THP-1 sont traitées avec des LPS à 0 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL ou 1 µg/mL (Weldon et al., 2007), tandis que les Schneider 2 et les hémocytes d'abeilles et de bourdons ont été traités à l'aide de 0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL de LPS (Tauszig et al., 2000). Les Schneider 2 ont été utilisées pour tester différentes conditions expérimentales, afin de mettre en place un protocole à utiliser pour les hémocytes d'abeilles et de bourdons. Ainsi

plusieurs modes d'exposition ont été testés avec ces cellules de drosophile. Les cellules Schneider 2 ont été exposées simultanément aux pesticides et aux LPS et également séparément. De ce fait les Schneider 2 ont tout d'abord été exposées aux pesticides pendant 24 heures, puis lavées avec du PBS et ensuite exposées aux LPS pendant 16 heures.

### **3.4. Réactivité cellulaire**

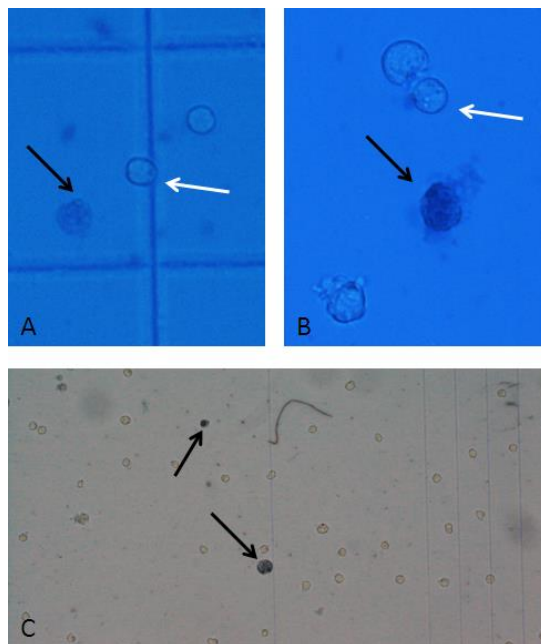
#### **3.4.1. Viabilité cellulaire**

La viabilité cellulaire est déterminée avec une solution de bleu trypan (2 g / L dans une solution de NaCl à 0,9%). Le bleu trypan est un colorant diazoïque utilisé pour la coloration vitale des cellules. Les cellules viables sont capables d'exclure le bleu trypan, au contraire des cellules mortes, ce qui conduit à une coloration bleue de ces dernières (Figure 15) (Tolnai, 1975).

Les cellules sont cultivées sur des plaques à 6 ou à 24 puits dans un milieu de culture spécifique à chaque type de cellule (voir ci-dessus 3.2.) ou dans du PBS en fonction des essais. Les cellules sont exposées aux sept concentrations d'imidaclopride retenues et sont incubées pendant 5 ou 24 heures dans des conditions cellulaires spécifiques à chaque type de cellule. Après incubation avec le pesticide, 40 µL de la suspension cellulaire à une concentration de  $7 \times 10^5$  cellules / mL sont mélangés à la même quantité de solution de bleu trypan. Après trois minutes, les cellules sont comptées au microscope à l'aide d'un hémocytomètre de Malassez. La viabilité est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Viabilité (\%)} = 100 - \frac{\text{nombre de cellules mortes}}{\text{nombre total de cellules (mortes et vivantes)}} * 100$$



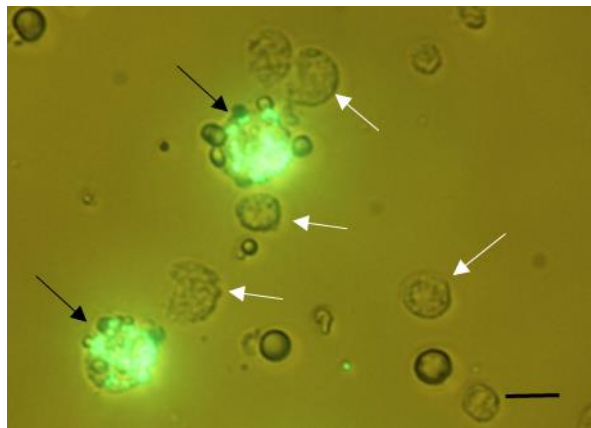


**Figure 15 : coloration typique au bleu trypan de cellules Schneider (A) et de THP-1 (B et C) après traitement à l'imidaclopride. Les cellules viables sont marquées avec des flèches blanches et les cellules mortes, avec une coloration bleue, avec des flèches noires.**

### 3.4.2. Phagocytose

L'activité phagocytaire des cellules est examinée après légères modifications de la méthodologie de Bennisroune et al. (2012) à l'aide de billes de latex jaune-vert fluorescentes en polystyrène modifié par une amine (taille de particule moyenne de 1  $\mu\text{m}$ ) (L1030 Sigma). Les THP-1 sont différenciées en leur phénotype macrophage 48 heures avant l'exposition au pesticide. Les THP-1 et Schneider sont cultivées sur des lamelles de verre à une concentration de  $7 \times 10^5$  cellules/mL sur des plaques à 6 puits ou à 12 puits. La phagocytose est mesurée après 5 heures et 24 heures d'exposition aux pesticides. 4 heures avant la mesure de phagocytose, 100 billes de latex par cellule diluées dans le milieu cellulaire particulier sont ajoutées à chaque puits des cellules exposées. Les cellules sont incubées avec les billes de latex dans les conditions de culture spécifiques à chaque type de cellule pendant encore 4 heures. Les cellules sont ensuite lavées avec 3% de BSA (albumine de sérum bovin) dans du PBS afin d'éliminer les billes de latex qui n'ont pas été phagocytées (Komiya et al., 2003). Les lamelles de verre des THP-1 différenciées et des Schneider 2 sont plongées trois fois dans

la solution de BSA avant d'être plongées dans du PBS. La phagocytose a été mesurée au microscope à fluorescence (Figure 16).



**Figure 16 : Phagocytose des hémocytes d'abeilles. Les flèches noires représentent les cellules phagocytaires et les flèches blanches, les cellules qui ne phagocytent aucune bille de latex fluorescente. La barre d'échelle est 10 µm.**

Pour les hémocytes d'abeilles et de bourdons, 25 µL d'hémolymphe sont extraits et dilués dans 250 µL de milieu WH-2. 40 µL de cellules (par la suite désignée comme goutte) exposées aux sept concentrations d'imidaclopride sont appliqués sur des lamelles de verre stériles. Chaque lamelle de verre est placée dans une boîte de Petri contenant du coton imbibé de PBS pour maintenir l'humidité pendant l'incubation. Les hémocytes sont incubés à 22°C dans l'obscurité pendant 5 ou 24 heures selon les essais. Quatre heures avant l'examen, environ 100 billes de latex par cellule sont ajoutées à chaque goutte. Après incubation, les hémocytes sont lavés avec 3% de BSA et avec du PBS seul pour les mesures en fluorescence.

Un minimum de 250 cellules est compté pour chaque échantillon. La phagocytose est calculée avec la formule suivante :

$$\text{Phagocytose (\%)} = \frac{\text{nombre de cellules ayant ingéré des billes}}{\text{nombre total de cellules}} * 100$$

NB : On considère qu'une cellule a ingéré des billes à partir d'au moins une bille internalisée ou au moins 20 billes en fonction du protocole expérimental retenu ( voir 4.2.1).

### 3.4.3. Détection de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire

Les cellules sont incubées dans 120 µL de PBS contenant le pesticide et les LPS pendant 3 heures. Les surnageants sont centrifugés à 160 x g pendant 5 minutes et stockés à -20°C dans le cas d'une analyse ultérieure.

Concernant l'analyse, la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déterminée avec un kit de dosage Amplex Red Peroxyde d'hydrogène / Peroxydase pour la détermination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Invitrogen, Cat. N ° A22188). Amplex Red est un colorant qui peut être utilisé pour détecter l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracellulaire (Kalyanaraman et al., 2012). En présence de peroxydase, le réactif Amplex Red réagit avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selon une stœchiométrie 1 : 1 pour produire le produit d'oxydation rouge, la résorufine. L'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PowerWave™ XS, BIO-TEK INSTRUMENTS, Serial NO. 198328).

### 3.4.4. Détection du NO

Le NO est mesuré au moyen du colorant fluorescent DAF-FM-DA selon les protocoles de Negri et al. (2017, 2014, 2013). Des solutions mères à 50 mM de DAF-FM-DA sont préparées dans du DMSO et maintenues à -20°C. Les cellules sont incubées dans des plaques à fond de verre à 96 puits dans du PBS contenant 5 µM de DAF-FM-DA (molecular probes D-23842). La fluorescence est ensuite mesurée avec un fluorimètre de 15 minutes à 4 heures d'exposition à l'imidaclopride. Les maxima d'excitation et d'émission de fluorescence sont à 495 et 515 nm.

### 3.4.5. Cytokines

Les monocytes et les macrophages différenciés des THP-1 sont cultivés dans des plaques à 24 puits dans un volume total de 700  $\mu\text{L}$  à  $7 \times 10^5$  cellules/mL. Après exposition aux pesticides, les surnageants sont extraits et centrifugés à  $160 \times g$  pendant 5 minutes. Les surnageants sont prélevés et répartis en 2 aliquotes de 350  $\mu\text{L}$  et conservés à  $-20^\circ\text{C}$  en cas d'utilisation ultérieure.

Les cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 et GM-CSF sont quantifiées à l'aide d'un test ELISA (dosage immunosorbant lié à une enzyme). Les cytokines contenues dans l'échantillon se lient aux anticorps immobilisés à la surface de la plaque ELISA. Des anticorps anti-humains des cytokines sont alors ajoutés. Ces anticorps, qui sont par ailleurs couplés à une enzyme, se lient aux cytokines. Le substrat de l'enzyme qui est utilisé forme un produit coloré lorsqu'il est transformé par l'enzyme couplée avec l'anticorps. L'absorbance est mesurée pour une analyse quantitative. L'IL-6 et le TNF sont quantifiés à partir de l'exposition des monocytes aux pesticides. Comme le GM-CSF est produit en moindre quantité par les monocytes, les cellules ont été différenciées en macrophage avant exposition aux pesticides, car celle-ci produisent plus de cytokines que les monocytes.

### 3.4.6. Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait des cellules avec un solvant RNA-Solv<sup>®</sup> Reagent (R6830) d'OMEGA bio-tek selon le protocole fourni avec le produit acheté.

Des cellules extraites de larves d'abeilles et de bourdons sont incubées pendant la nuit pendant 18 heures dans des plaques de 24 puits à  $22^\circ\text{C}$ . 25  $\mu\text{L}$  d'hémolymphe de larves d'abeilles ou 40  $\mu\text{L}$  de larves de bourdons sont diluées dans 0,5 mL de milieu WH-2 (voir point 3.1.3) dans chaque puits. Pour chaque contrôle et concentration d'IMI, six larves différentes ont été incubées dans des puits séparés. Après 18 heures d'incubation, les cellules des six

larves sont lysées avec le solvant d'ARN et regroupées dans un tube pour une extraction d'ARN supplémentaire.

Les suspensions cellulaires correspondant aux six larves d'un même traitement ont été regroupées dans un tube et centrifugées. Les surnageants sont éliminés et les cellules sont lysées avec 1 mL de solvant d'ARN. 0,2 mL de chloroforme sont ajoutés par 1 mL de solvant ARN et le tube est agité pendant 15 secondes. Le tube est ensuite incubé sur de la glace pendant 10 minutes, puis centrifugé à 12000 x g pendant 15 minutes. Après centrifugation, 80 % de la phase aqueuse sont transférés dans un tube frais et 500 µL d'alcool isopropylique est ajoutés. Ce mélange est incubé pendant 10 minutes et centrifugé pendant 10 minutes à 12000 x g. Les surnageants sont éliminés et 1 mL d'éthanol à 80 % est ajouté à chaque tube. Les tubes sont agités et centrifugés pendant 5 minutes à 7500 x g. L'éthanol est aspiré et le culot d'ARN est séché à l'air pendant 2 à 5 minutes. Le culot d'ARN est ensuite dissous dans 60 µL d'eau exempte de nucléase et stocké à -80 °C dans deux aliquotes. 15 µL sont conservés pour le traitement à la DNase, les électrophorèses sur gel et pour la synthèse d'ADNc.

8 µL d'ARN sont incubés avec 1 µL de tampon de réaction 10x (+ MgCl<sub>2</sub>) et 1 µL de 0,36 U DNase (sans RNase) à 37°C pendant 30 minutes. 1 µL d'EDTA (50 mM) sont ajoutés et incubés à 65°C pendant 10 minutes.

Avant la synthèse de l'ADNc, la concentration de l'ARN est déterminée par le rapport d'absorbance de 260/280 et 260/230. L'absorbance est lue avec un spectrophotomètre BioSpecNano (Shimadzu corp. Serial No. A11574800452).

### 3.4.7. Synthèse de l'ADNc

L'ADNc est synthétisé à l'aide d'un kit de synthèse d'ADNc RevertAid H Minus First Strand cDNA sythesis Kit (#K1631) de Thermo Scientific.

Dans un tube sur glace, 150 ng d'ARN et 1 µL d'amorce aléatoire sont ajoutés et complétés avec de l'H<sub>2</sub>O à 12 µL. Les tubes sont centrifugés et chauffés à 65°C pendant 5 minutes. Les

tubes sont immédiatement refroidis sur de la glace et 4  $\mu\text{L}$  de tampon de réaction 5X, 1  $\mu\text{L}$  d'inhibiteur de la RNase RiboLock (20 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de mélange dNTP de 10 mM et 1  $\mu\text{L}$  de RevertAid H Minus M-Mul V Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{L}$ ) sont ajoutés à la réaction. Les tubes sont incubés à 42°C pendant 60 minutes puis 70°C pendant 5 minutes. La concentration d'ADN est déterminée par absorbance et la qualité de l'ADNc est lue sur un gel d'agarose. L'ADNc est conservé à - 80°C pour des analyses ultérieures.

### 3.4.8. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'ARN extrait et l'ADNc synthétisé sont soumis à une électrophorèse sur gel afin de déterminer leur qualité. Nous avons utilisé un gel d'agarose à 1 % dans du TBE (89 mM Tris-HCl pH 7,8 ; 89 mM borate ; 2 mM EDTA). 0,75 g d'agarose sont mélangés dans 45 mL d'H<sub>2</sub>O et 5 mL de TBE 10X. La solution est chauffée à la micro-onde jusqu'à ce qu'elle apparaisse claire. Après avoir laissé le gel refroidir un peu, 2  $\mu\text{L}$  de Gel Red sont ajoutés. La solution est versée sous forme de gel et refroidie jusqu'à solidification. Une fois durci, le gel est immergé dans du TBE 1X. Des échantillons d'ARN ou d'ADNc sont déposés dans les puits du gel et la migration est réalisée sous la tension de 95 V pendant une heure.

### 3.4.9. qPCR

Les analyses d'expression d'ARN ont été effectuées à l'aide de l'ADNc obtenu par transcriptase inverse (décrite au point 3.3.7) suivie d'une PCR spécifique en temps réel avec SYBR® GREEN. Chaque échantillon est analysé en quadruplés dans un volume réactionnel total de 20  $\mu\text{L}$ , contenant 25 nM de chaque amorce d'abeille (50 nM pour chaque amorce de bourdon), 300 ng d'ADNc et 10  $\mu\text{L}$  de SYBR® GREEN. Des réactions sont effectuées sur un Thermocycleur « MyiQ™2 Two Color Real-Time PCR Detection System » de Bio-rad avec le logiciel Bio-Rad iQ5.

Les conditions utilisées pour les cycles sont de 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 6 minutes, suivies de 45 cycles de 95°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes.

Pour chaque expérience, deux réactions sans ADNc ont été incluses comme témoins négatifs. La spécificité du produit PCR est vérifiée par analyses des courbe de fusion (de 50 à 98°C avec 11 s pour chaque étape un pas de 0,5°C) pour tous les échantillons. Les valeurs du cycle seuil (Ct) sont déterminées pour la même ligne de seuil de fluorescence pour chaque gène et la valeur du Ct de chaque échantillon est obtenue en calculant la moyenne arithmétique des quatre répliques. Les données ont été analysées à l'aide de la méthode  $\Delta\Delta Ct$  de Livak and Schmittgen (2001). Les valeurs de Ct du gène cible, qui ont été normalisées à une référence endogène sont relativisées avec un calibre. Les  $\Delta Ct$  ont été déterminées en soustrayant la valeur Ct moyenne du gène cible de la valeur Ct moyenne du gène de référence. Les gènes de référence sont des gènes qui ont des expressions génétiques similaires à différents stades de développement d'un organisme et dont l'abondance ne varie pas en raison de facteurs environnementaux (Lourenço et al., 2008). En général, ces gènes sont exprimés dans le cytosquelette ou tiennent compte des fonctions cellulaires de base et omniprésentes. On a choisi les gènes actine et rp49 pour l'abeille et le gène RPS5 pour le bourdon comme gènes de références. La valeur  $\Delta\Delta Ct$  a été déterminée en soustrayant chaque valeur  $\Delta Ct$  de la valeur  $\Delta Ct$  du calibre. Le calibre a été défini comme étant la valeur moyenne de la valeur  $\Delta Ct$  du contrôle sans pesticides de chaque traitement LPS différent. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2 : Liste des amorces des abeilles et des bourdons utilisé pour la qPCR.**

	Locus	Foward Primer	Reverse Primer	Reference
<i>Apis mellifera</i>	defensin 1	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	AATGGCACTTAACCGAAACG	Evans et al. 2006
	myD88	TCACATCCAGATCCAACCTGC	CAGCTGACGTTTGAGATTTTTG	Evans et al. 2006
	relish	GCAGTGTTGAAGGAGCTGAA	CCAATTCTGAAAAGCGTCCA	Evans et al. 2006
	Spätzle	TGCACAAATTGTTTTCTGA	GTCGTCCATGAAATCGATCC	Evans et al. 2006
	TEP-A	CAAGAAGAAACGTGCGTGAA	ATCGGGCAGTAAGGACATTG	Evans et al. 2006
	actin	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	AGAATTGACCCACCAATCCA	Lourenco et al. 2008
	rp49	CGTCATATGTTGCCAACTGGT	TTGAGCACGTTCAACAATGG	Lourenco et al. 2008
<i>Bombus terrestris</i>	defensin	CGATAGACAAAGAAGAGTGA	AGAGATCCCTTGAAGTTGGT	Erler et al. 2011
	TEP-A	CAGCAGTAAAAATCCCGAC	TACAGGTTACTCCACAGCCC	Barribeau et al. 2013
	relish	CAGCAGTAAAAATCCCGAC	CAGCACGAATAAGTGAACATA	Schlüns et al. 2010
	RPS5	AATTATTTGGTCGTTGGAATTG	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	Schlüns et al. 2010

### 3.5. Statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide de XLSTAT d'Addinsoft (2019), Long Island, NY, USA. Pour tous les tests, un niveau de probabilité de 0,05 est considéré comme statistiquement significatif. Après avoir vérifié la normalité et l'homogénéité de la variance à l'aide du test de Shapiro-Wilk et du test de Bartlett, une analyse de variance à sens unique (ANOVA) a été effectuée pour identifier les différences entre les différents groupes IMI de chaque traitement LPS, puis un test de Tukey de comparaisons multiples entre les différents groupes IMI du même traitement LPS. Si les conditions paramétriques, la normalité et l'homogénéité de la variance n'ont pas été validées même après la transformation logarithmique ou arcsine, nous avons effectué un test Kruskal-Wallis non paramétrique avec une comparaison post hoc Conover-Iman pour les différents groupes d'IMI du même groupe de traitement de LPS.

Les résultats sont exprimés par la moyenne de toutes les répétitions  $\pm$  SE (erreur standard).

Comme l'activité hémocytaire varie d'un individu à l'autre, tous les résultats pour l'abeille et le bourdon sont exprimés en pourcentage des groupes traités par rapport au groupe témoin (sans IMI).

Les hémocytes de différentes larves n'ont pas été regroupés, car le mélange modifierait une réaction immunitaire entre les hémocytes de différentes larves.

Les couleurs utilisées pour transcrire les résultats (histogrammes, courbes) correspondent aux différents traitements, une couleur étant associée à un unique traitement. Les résultats statistiques permettant de comparer les valeurs d'un même traitement sont donnés dans la même couleur. De plus, des lettres identiques, de même couleur, montreront l'absence de différence statistiquement significative ( $p > 0,05$ ) alors que des lettres différentes, de même couleur, indiqueront une différence statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).



# **RESULTATS ET DISCUSSION**



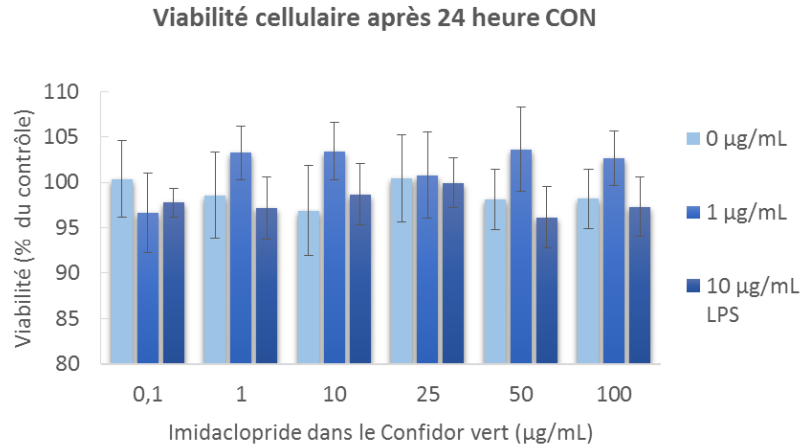
## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1. Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules immunitaires de quatre espèces différentes a été examinée pour vérifier si les concentrations choisies d'IMI utilisées dans les différentes procédures d'exposition étaient sublétales. La viabilité a été examinée après 5 ou 24 heures d'exposition à la molécule active l'IMI et après 24 heures d'exposition à sa formulation commerciale, le Confidor vert.

#### 4.1.1. Hémocytes d'abeilles (*Apis mellifera*)

La viabilité des hémocytes d'abeilles a été examinée après 24 heures d'exposition au pesticide dans le milieu WH-2 (voir 3.2.3). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée à aucune concentration testée, ni de la molécule active elle-même, ni de sa formulation commerciale, le Confidor vert. La viabilité cellulaire des hémocytes d'abeilles pour toutes les concentrations d'IMI et le témoin négatif était d'environ  $59,8 \pm 2,4$  % tandis que pendant l'exposition au Confidor vert, elle était d'environ  $82,6 \pm 1,8$  %. L'activation immunitaire avec les LPS n'a eu aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire aux concentrations testées du Confidor vert (Figure 17, voir ANNEXE 3 pour les analyses statistiques). La viabilité cellulaire moyenne était de  $84,5 \pm 1,3$  % avec  $1 \mu\text{g/mL}$  LPS et de  $84,7 \pm 0,8$  % avec  $10 \mu\text{g/mL}$  LPS.

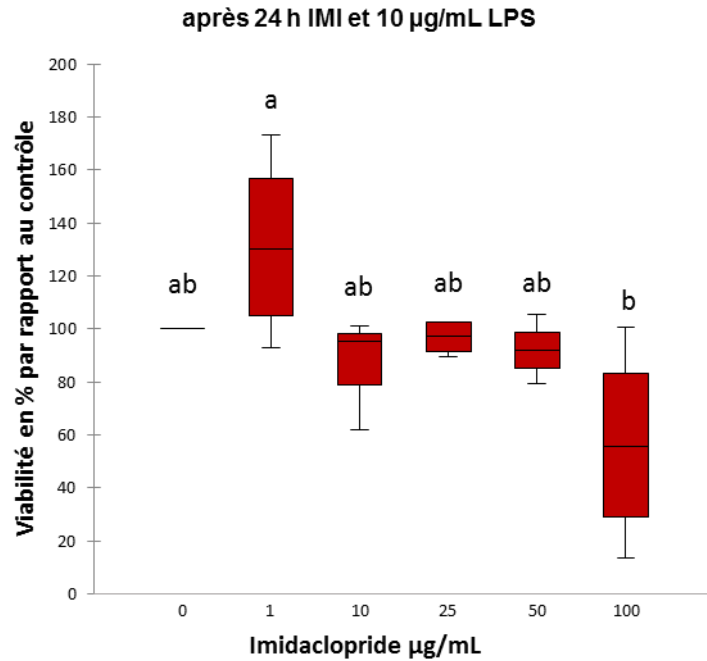


**Figure 17 : Viabilité cellulaire de l'abeille après 24 heures d'exposition au Confidor vert. La viabilité est exprimée en pourcentage de chaque groupe de traitement par rapport au groupe témoin négatif sans exposition au Confidor vert. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe témoin et toutes les concentrations testées de Confidor vert au cours des différents groupes de traitement par LPS 0, 1 et 10 µg/mL (voir ANNEXE 3 pour les tests statistiques).**

#### 4.1.2. Hémocytes de bourdons (*Bombus terrestris*)

La viabilité cellulaire des hémocytes de bourdons après une exposition de 24 heures à l'IMI était de  $56,5 \pm 4,8$  % pour le groupe témoin sans IMI et diminuait à  $32,3 \pm 5,7$  % avec la concentration la plus élevée (100 µg/mL). Bien que nous ayons observé une diminution de la viabilité de 42,8 % par rapport au groupe témoin, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe témoin et toutes les concentrations d'IMI testées. L'activation immunitaire avec LPS à 1 µg/mL et 10 µg /mL n'a pas montré d'effet statistiquement significatif sur la viabilité cellulaire pendant l'exposition à l'IMI par rapport au groupe témoin. À l'activation immunitaire élevée de 10 µg/mL de LPS et à 1 µg/mL d'IMI, la viabilité des LPS augmentait de 30 % alors qu'elle diminuait à environ 50 % par rapport au témoin à la concentration d'IMI la plus élevée (figure 18).

Le Confidor vert n'a pas modifié la viabilité cellulaire des hémocytes de bourdons à toutes les concentrations testées sans ou avec activation immunitaire par les LPS (voir ANNEXE 3 pour les analyses statistiques). La viabilité était d'environ 60 % pour 0 et 1 µg/mL de LPS et d'environ  $50,9 \pm 1,2$  % pour 10 µg/mL de LPS.

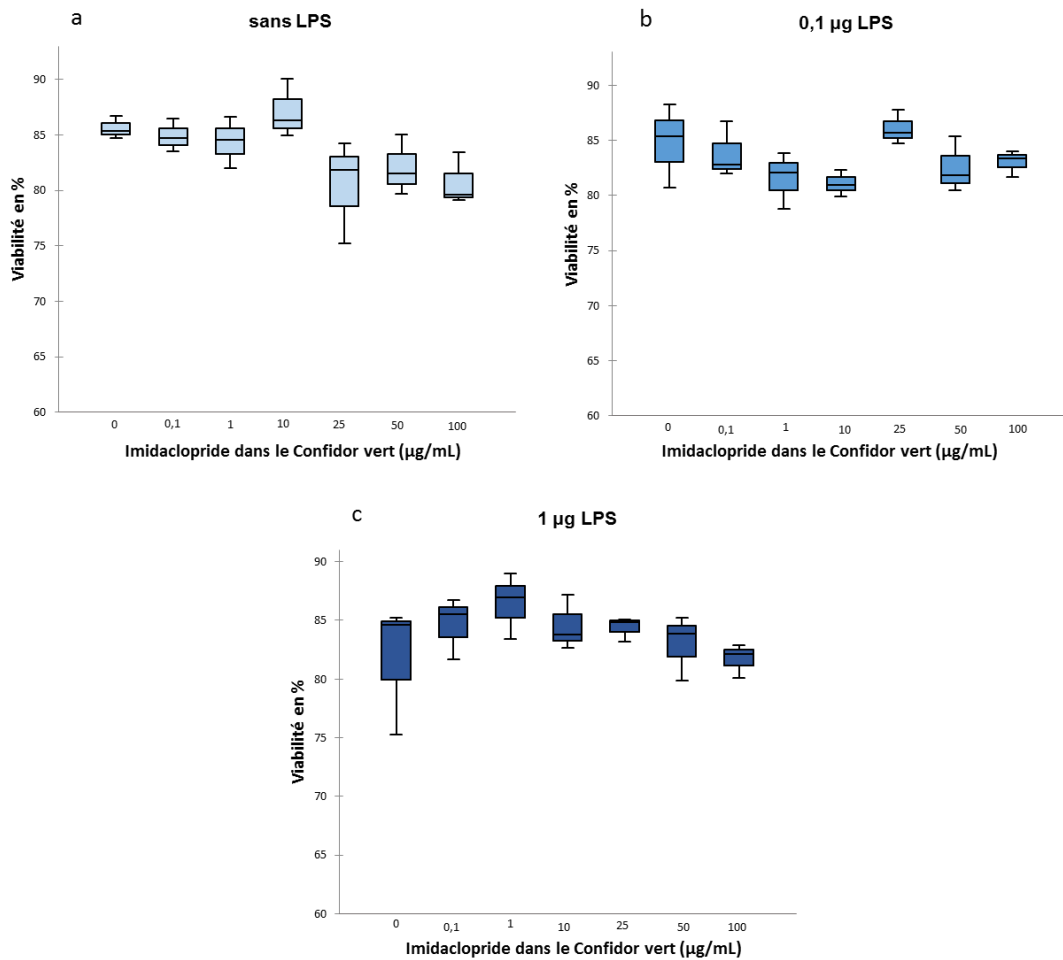


**Figure 18 : Viabilité des hémocytes de bourdons après exposition à l'IMI et activation immunitaire avec 10 µg/mL LPS. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives (tests statistiques ANNEXE 3).**

#### 4.1.3. Cellules humains THP- 1

La viabilité des THP-1 n'a montré aucune différence statistiquement significative après 5 ou 24 heures d'exposition à différentes concentrations d'imidaclopride (0, 1, 25, 50 et 100 µg/mL). Le pourcentage de cellules viables après 5 heures variait entre  $88,75 \pm 1,31$  % et  $94,83 \pm 0,38$  %, groupe témoin compris. Le pourcentage de cellules viables après 24 heures d'exposition variait entre  $94,26 \pm 0,29$  % et  $95,37 \pm 0,55$  %. Aucune toxicité aiguë n'a été observée pour les concentrations d'imidaclopride utilisées sur les THP-1 (voir ANNEXE 3 pour les analyses statistiques).

La viabilité des cellules THP-1 a été examinée après 24 heures d'exposition au Confidor vert avec une activation immunitaire simultanée avec 0,1 ou 1 µg/mL de LPS. Le Confidor vert n'a pas affecté la viabilité des cellules THP-1, quelle que soit la concentration testée, que ce soit avec ou sans activation immunitaire (Figure 19).



**Figure 19: Viabilité cellulaire des THP-1 après 24 heures d'exposition au Confidor vert et 0 ; 0,1 et 1 µg/mL de LPS. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les différents groupes.**

#### 4.1.4. Schneider 2 (*Drosophila melanogaster*)

La viabilité cellulaire des Schneider 2 de *D. melanogaster* était plus élevée après 5 heures qu'après 24 heures d'exposition à l'IMI. La viabilité cellulaire variait entre  $88,4 \pm 0,47\%$  et  $90,9 \pm 0,96\%$  après 5 heures et entre  $84,6 \pm 1,73\%$  et  $80,4 \pm 1,84\%$  après 24 heures. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le groupe témoin sans IMI et les différentes concentrations d'IMI ni après 5 heures ni après 24 heures.

Aucune toxicité aiguë n'a été observée pour les concentrations testées (0, 1, 25, 50 et 100 µg/mL) d'IMI sur des Schneider 2 de *Drosophila melanogaster* (voir ANNEXE 3 pour les analyses statistiques).

#### 4.1.5. Comparaison de la viabilité des cellules immunitaires chez les quatre espèces

Selon nos résultats, l'IMI n'a réduit la viabilité de façon significative ni des THP-1 de l'Homme, ni des cellules Schneider 2 de la drosophile, ni des hémocytes d'abeilles mellifères ou de bourdons à aucune concentration testée jusqu'à 100 µg/mL IMI. La même chose a été observée lors de l'examen de la viabilité cellulaire des hémocytes humains, d'abeilles mellifères et de bourdons exposés à la formulation commerciale de l'IMI, le Confidor vert. Même une activation immunitaire avec les LPS n'a montré aucune altération statistiquement significative de la viabilité cellulaire d'aucun type de cellule exposé au Confidor vert. Nous travaillons donc avec des doses cellulaires sublétales dans nos conditions expérimentales.

La viabilité cellulaire s'est révélée plus élevée dans les deux lignées cellulaires continues de THP-1 et Schneider 2 (80 % à 95 %) que dans les hémocytes d'abeilles et de bourdons (environ 60 à 70 %). Les hémocytes d'abeilles mellifères et de bourdons ne peuvent pas être conservés en lignées cellulaires continues (Goblirsch et al., 2013). Les cellules doivent donc être extraites des larves, juste avant l'expérience. Bien que l'IMI n'ait eu aucun impact important sur la viabilité des hémocytes d'abeilles après 24 heures d'exposition *in vitro*, elle a réduit la viabilité des hémocytes de bourdons de 42 % à notre plus forte concentration testée, soit 100 µg/mL d'IMI (Figure 18). Comme la viabilité des cellules extraites souffre de la durée d'exposition pendant les expériences *in vitro*, celle-ci pourraient interférer avec la mesure de l'effet réel du pesticide. De plus, nous avons observé un impact plus important de l'IMI avec le temps, chez les cultures cellulaires de THP-1 et Schneider 2 ; il est donc possible que des concentrations plus faibles que celles testées puissent causer une altération de l'activité des hémocytes pour un temps d'incubation plus long. En conséquence, nous avons utilisé des doses plus fortes en considérant des temps d'exposition courts mais avec des doses d'IMI plus élevées par rapport

aux concentrations rencontrées dans l'environnement (jusqu'à 101 ng/g IMI dans le pollen) (Dively and Kamel, 2012). Les concentrations utilisées lors des expériences allaient de 0,1 µg/mL à 100 µg/mL. Chauzat et al. (2009) et Kasiotis et al. (2014) ont détecté 5,7 à 73,9 ng/g d'imidaclopride dans le pollen ou chez les abeilles domestiques avec 5,7 ng/g (Kasiotis et al., 2014) et jusqu'à 82 ng/g dans les abeilles indigènes (Hladik et al., 2016). La DL<sub>50</sub> pour les abeilles mellifères variait de 4,5 ng à 81 ng/abeille par ingestion orale (Cresswell, 2011; Nauen et al., 2001) et de 18 ng à 102 ng/abeille pendant le contact (Iwasa et al., 2004; Nauen et al., 2001). Le poids corporel moyen d'une abeille ouvrière est d'environ 0,2 g et celui des bourdons d'environ 0,1 à 0,8 g, leur taille augmentant avec l'âge de la colonie. Par conséquent, les valeurs DL<sub>50</sub> pour les abeilles mellifères sont d'environ 0,02 à 0,4 µg/g. Chez la drosophile, la DL<sub>50</sub> par ingestion orale a été estimée entre 0,41 et 1,39 µg/g (Arain et al., 2014). Cependant, comme l'intoxication a été réalisée *in vitro*, la prise compte de la dégradation métabolique de l'IMI par l'organisme entier manque dans notre expérience afin de simuler des conditions plus réalistes. La toxicité des métabolites IMI qui se forment pendant la dégradation de la molécule mère est particulièrement préoccupante (Suchail et al., 2004a). L'IMI a montré un métabolisme similaire chez les abeilles comme chez *Drosophila melanogaster*. Ainsi, chez les abeilles, la demi-vie de l'IMI est de 4,5 heures (Chauzat et al., 2009) et se décompose en plusieurs métabolites comme l'acide 6-chloronicotinique et un dérivé de l'urée (Suchail et al., 2004). Suchail et ses collaborateurs (2004) affirment que la mortalité des abeilles est davantage due à l'action des métabolites qu'à celle de la molécule mère réelle. De plus, ces métabolites pourraient avoir d'autres effets toxicologiques sur les organismes hôtes. En raison de sa courte demi-vie, les concentrations d'exposition des abeilles à l'IMI pourraient être beaucoup plus élevées que les concentrations, qui sont mesurées dans l'abeille, selon le moment où elle a ingéré du nectar contaminé pour la dernière fois. Cependant, comme les néonicotinoïdes sont des pesticides systémiques, les pollinisateurs sont plutôt exposés à une faible concentration continue qu'à une concentration ponctuelle élevée : il est donc probable que les abeilles conservent une certaine concentration résiduelle de pesticides dans leur corps pendant de longues périodes de temps en raison de la consommation continue de pesticides.



## 4.2. Phagocytose

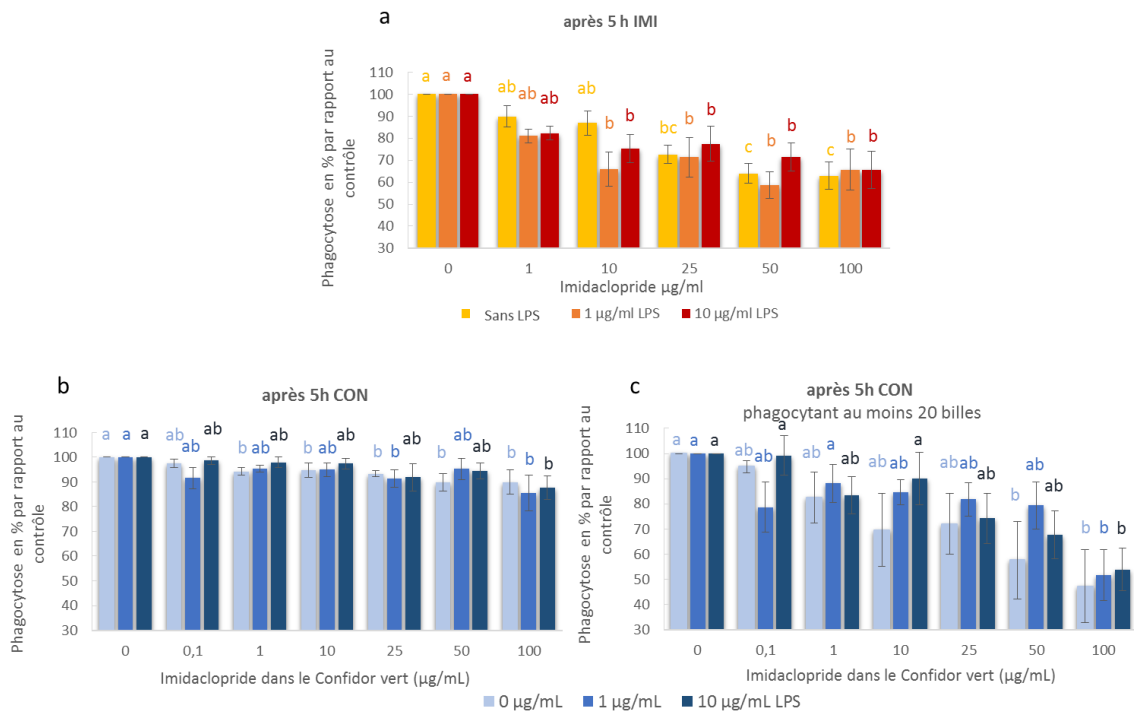
Pour notre étude, nous avons choisi des cellules immunitaires de type macrophage de quatre espèces différentes, qui sont toutes capables de phagocytose. Chez les insectes, la phagocytose ne joue pas seulement un rôle important dans la défense contre les pathogènes, elle est aussi un facteur important lors de la métamorphose car elle élimine les tissus dégénérés et les cellules apoptotiques (Feldhaar and Gross, 2008). Chez les insectes et les mammifères, la phagocytose des agents pathogènes, comme les bactéries et les champignons, joue un rôle majeur, surtout au cours des premières réponses immunitaires. Nous avons étudié l'impact de l'IMI et du Confidor vert sur la capacité phagocytaire des quatre cellules phagocytaires (macrophage-like) après 5 et 24 heures sous activation immunitaire.

### 4.2.1. Hémocytes d'abeilles (*Apis mellifera*)

Pour les trois concentrations de LPS utilisées (0, 1 et 10 µg/mL), l'IMI a diminué de façon significative la capacité de phagocytose des hémocytes larvaires d'abeilles après 5 heures d'exposition de façon dose-dépendante (Fig.20 a ; voir ANNEXE 4 pour les détails statistiques). Bien que l'activité phagocytaire soit diminuée de façon significative, après action de l'IMI entre 25 µg/mL et 100 µg/mL d'IMI sur des cellules non activées aux LPS, elles sont déjà affectées à partir de 10 µg/mL d'IMI lorsque les cellules sont activées avec 1 ou 10 µg/mL LPS. En moyenne, 82,8 % ± 2,5 % des cellules du groupe témoin sans activation par les LPS ont été capables de phagocyter au moins une bille de latex, alors que le pourcentage de phagocytose diminue de 35 % à 62,9 % ± 4,5 % à la concentration d'IMI utilisée la plus élevée (100 µg/mL). Le traitement aux LPS seuls à faible ou forte concentration n'a pas affecté la capacité de phagocytose des cellules d'abeilles (1 LPS, 73,0 ± 4,6 % et 10 LPS 78,4 % ± 3,2 %). Les résultats pour les hémocytes d'abeilles ne sont donnés qu'après 5 heures d'exposition car les cellules se sont révélées moins adhérentes aux lames en verre après 24 heures d'exposition à l'IMI. De nombreuses cellules ont été perdues pendant le processus de lavage pour éliminer les billes de latex fluorescentes en excès.

## RESULTATS ET DISCUSSION

La phagocytose a été analysée plus en détail après exposition au Confidor vert. Pour ces expériences, nous avons ajouté une concentration moins forte et proche de celles trouvées dans l'environnement Confidor vert contenant 0,1 µg/mL d'IMI. Le Confidor vert a réduit significativement la phagocytose sans activation immunitaire aux LPS à partir de 1 µg/mL d'IMI (Figure 20b).



**Figure 20 : Phagocytose d'hémocytes d'abeilles après 5 heure d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b et c). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS.**

Bien que nous ayons observé un impact décroissant du Confidor vert sur la phagocytose à une concentration dix fois plus faible qu'après exposition à l'IMI pur, il réduit la phagocytose à un taux inférieur à celui de la molécule mère. Même à la concentration la plus élevée, la phagocytose après action du Confidor vert n'a diminué que d'environ 10 % par rapport au témoin, alors que pour sa molécule pure (IMI), elle diminue jusqu'à 35 %. Alors qu'environ 80 % des hémocytes ont été capable de phagocyter dans le groupe témoin pendant les expériences avec l'IMI, 92,6 % ± 2,8 % du groupe témoin ont phagocytées pendant les expériences avec le Confidor vert. Cependant, il faut tenir compte, que nous ne faisons la

différence qu'entre les cellules capables de phagocyter au moins une bille fluorescente et celles qui ne phagocytèrent aucune bille du tout. Comme le montre la figure 26, les cellules ont pu englober de nombreuses billes, ce qui a rendu impossible le comptage de leur nombre réel. Nous avons cependant observé au microscope des cellules qui ont clairement ingéré moins de billes que d'autres. À mesure que les concentrations d'IMI augmentaient, nous avons observé plus de cellules qui ne phagocytèrent pas complètement. Par conséquent, nous avons également compté toutes les cellules qui ont phagocytées moins de 20 billes (nombre limite de comptage). La figure 20c montre que les hémocytes d'abeilles ont phagocyté moins de billes avec des concentrations d'IMI plus élevées qu'avec le Confidor vert. Le Confidor vert a réduit l'efficacité phagocytaire des hémocytes d'abeilles à des concentrations croissantes. À la concentration maximale (100 µg/mL d'IMI dans le Confidor), le produit commercial réduit l'efficacité des cellules à phagocyter jusqu'à environ 50 % par rapport au témoin avec ou sans LPS. Dans les deux modèles expérimentaux de phagocytose (à partir d'une bille ou supérieur à 20 billes) aucune concentration en LPS a eu une influence supplémentaire sur la phagocytose.

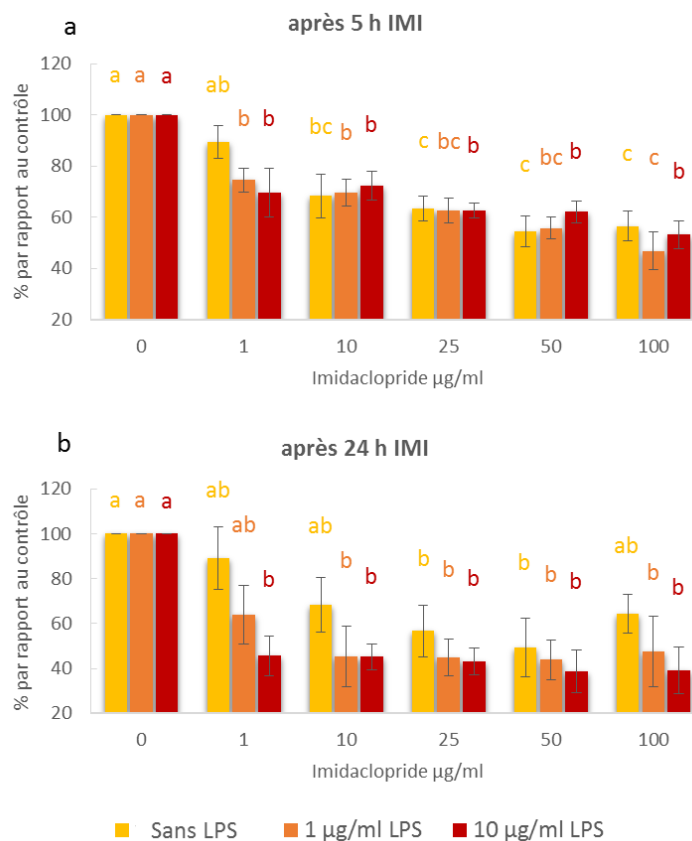
#### 4.2.2. Hémocytes de bourdons (*Bombus terrestris*)

La capacité à phagocyter les billes de latex a diminué de façon significative dans les hémocytes des larves de bourdons après 5 heures d'exposition à l'IMI, entre 10 µg/mL et 100 µg/mL lorsque les cellules n'étaient pas en présence de LPS (Figure 21). Lorsque les cellules ont été soumises à 1 ou 10 µg/mL de LPS, l'IMI réduit la phagocytose de plus de 25 % par rapport au témoin, jusqu'à 45 % pour la concentration maximale de 100 µg/mL d'IMI (voir ANNEXE 4 pour les tests statistiques). En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes à différentes concentrations de LPS. Dans les groupes témoins sans pesticide, 61,4 % ± 5,5 %, 51,5 % ± 5,2 % et 57,83 ± 7,4 % des cellules ont pu phagocyter au moins une bille après 5 heures d'exposition à 0 µg/mL, 1 µg/mL et 10 µg/mL de LPS respectivement.

L'effet inhibiteur de l'IMI sur la phagocytose dans les hémocytes de bourdons était encore plus fort après 24 heures d'exposition. La phagocytose passe de 69 % après cinq heures à 45 %

## RESULTATS ET DISCUSSION

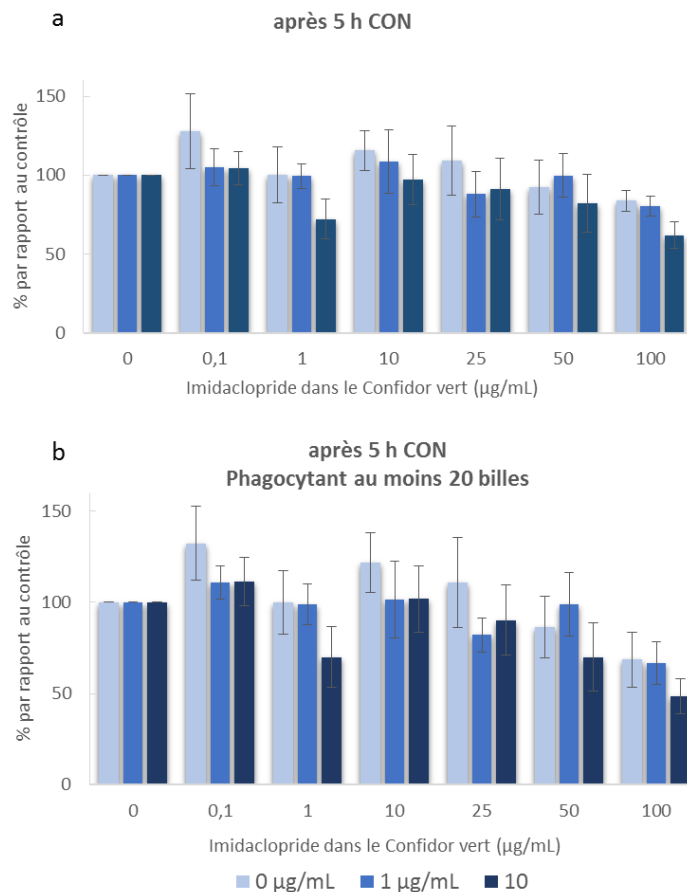
après 24 heures à 1 µg/mL d'IMI et au traitement LPS et plus élevé par rapport au groupe témoin (figure 21b). Lorsque les cellules étaient exposées à une concentration élevée de LPS, la phagocytose a été significativement réduite à partir de la concentration de 1 µg/mL d'IMI. D'un autre côté, avec une faible activation par LPS, l'IMI n'a eu un impact important qu'après 10 µg/mL et sans LPS après 25 µg/mL, bien qu'il faille mentionner que la phagocytose après 24 heures dans les groupes témoins sans pesticide est tombée à environ 18,5 % ± 3,5 % sans tenir compte des différents traitements aux LPS. La perte d'efficacité de la phagocytose pourrait être due à l'utilisation des cellules en culture primaire dont la santé des cellules diminue avec le temps.



**Figure 21 : Phagocytose des hémocytes de bourdons après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement aux LPS (Voir ANNEXE 4 pour les tests statistiques).**

Nous avons donc décidé de tester l'impact du Confidor vert après 5 heures d'exposition au lieu de 24 heures. Contrairement à notre hypothèse, le Confidor vert a eu un impact moindre sur la phagocytose du bourdon après 5 heures que sa molécule pure. A de faibles concentrations d'IMI, nous avons même observé une légère augmentation de la phagocytose dans les hémocytes, alors qu'à des concentrations d'IMI plus élevées et à forte activation par les LPS, la phagocytose était réduite d'environ 30 % par rapport au contrôle (Figure 22). Cependant, nous n'avons trouvé aucune différence statistiquement significative pour aucune concentration testée de Confidor vert et à aucun traitement LPS pour la phagocytose en totale (voir analyses statistiques ANNEXE 4). Encore une fois, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, pendant 24 heures d'exposition à l'IMI, le pourcentage moyen de cellules phagocytaires était assez faible dans le groupe témoin sans exposition aux pesticides, comparativement aux premiers essais. Sans traitement aux LPS, seuls  $20,5 \% \pm 3,2 \%$  ont pu phagocyter au moins une bille de latex, alors que nous avons observé plus de 60 % d'hémocytes phagocytaires dans des expériences antérieures. Comme déjà mentionné ci-dessus pour les abeilles mellifères (voir 4.2.1), nous avons également évalué l'efficacité des cellules phagocytaires en comptant le nombre de cellules qui ont seulement phagocytisé un maximum de 20 billes de latex. Lors de cette expérience avec des hémocytes de bourdons,  $17,4 \% \pm 3,3 \%$  des  $20,5 \%$  de cellules phagocytaires, soit près de 85 % des cellules phagocytaires, n'étaient capables de phagocyter que 20 billes au maximum. Ceci montre une très faible efficacité de la phagocytose pour le groupe témoin. Dans le groupe témoin exposé pendant 5 heures à l'IMI, les cellules étaient plutôt chargées de billes de latex et il était rare de trouver des cellules qui ne phagocytaien pas plus de 20 billes de latex. De plus, les hémocytes d'abeilles ont montré un comportement similaire lors des expériences de phagocytose. L'expérience pour le Confidor vert a été réalisée à la fin de l'automne (septembre à novembre 2018), tandis que l'exposition à l'IMI a été réalisée pendant les mois d'été (juin à début septembre 2017). Les ruches de bourdons étaient gardées dans une serre biologique, mais les fenêtres restaient ouvertes et la serre n'était pas chauffée. Une température plus froide pendant les nuits d'automne pourrait jouer un rôle dans la forme physique des larves. Même si les larves de bourdons n'ont été échantillonnées que pendant les semaines où la température ne descendait pas en dessous de  $4^{\circ}\text{C}$  la nuit, elles étaient également protégées du froid par l'ajout d'une couche isolante supplémentaire de laine dans

la ruche. Une autre explication pourrait être l'âge différent des ruches de bourdons. Bien que les bourdons soient des insectes eusociaux comme les abeilles domestiques, ils n'ont pas le même développement qu'une ruche d'abeilles. Alors que la reine d'une ruche d'abeilles peut atteindre l'âge de 5 ans (Boucher 2016), les colonies de bourdons n'atteignent généralement que 16 semaines environ. Les ouvrières de bourdons deviennent plus grosses à mesure qu'elles émergent dans une colonie, ce qui donne d'énormes ouvrières qui finissent par tuer leur reine et s'envolent pour former de nouvelles colonies. Nous supposons cependant que l'âge des ruches de bourdons utilisées pendant l'expérience ne devrait pas avoir trop d'impact car les ruches étaient constamment renouvelées.



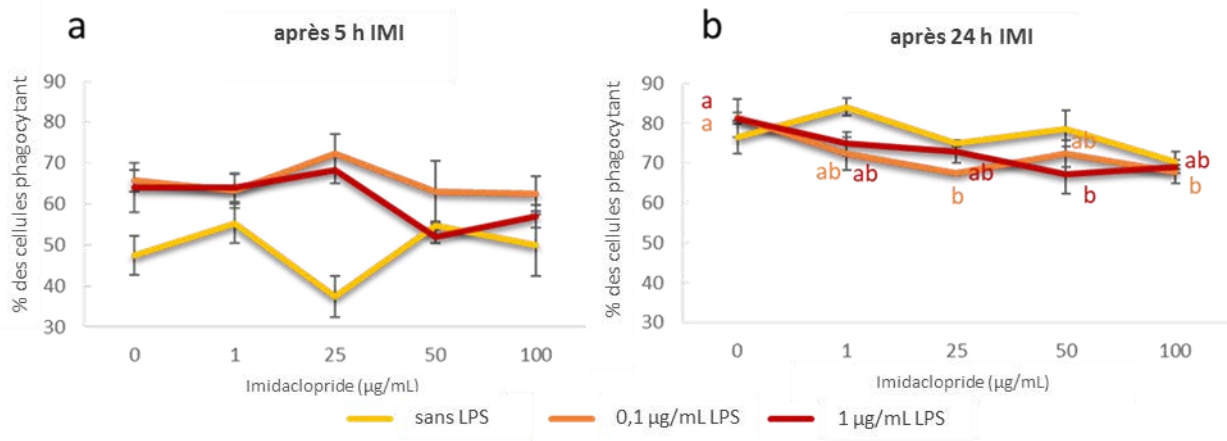
**Figure 22: Phagocytose des hémocytes de bourdons de la fin de l'automne après exposition au Confidor vert. a) montre les pourcentages de cellules qui ont été capables de phagocyter au moins une bille de latex, tandis que b) montre les pourcentages de cellules qui ont phagocytés plus de 20 billes de latex. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans aucun groupe des traitements de LPS (pour des détails statistiques, voir l'ANNEXE 4).**

### 4.2.3. Cellules humaines : THP-1

La phagocytose dans les THP-1 a été mesurée après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI sous forme de molécule pure. Les cellules ont été différenciées en leur phénotype macrophage avant les analyses de phagocytose. Seulement  $4,56 \pm 0,61$  % des THP-1 phagocytèrent au moins une bille de latex après 4 heures d'incubation avec les billes, tandis que la phagocytose augmentait à  $61,94 \pm 7,06$  % avec des THP-1 différenciées. Une fois différenciés, les macrophages ont été stimulés par une activation immunitaire de  $0,1 \mu\text{g/mL}$  ou de  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS. Les pourcentages de cellules phagocytaires de la même population ont augmenté en moyenne d'environ  $16,4$  % alors qu'elles étaient stimulées par les LPS. La phagocytose mesurée après une exposition de 5 heures à l'IMI et l'absence d'activation immunitaire était comprise entre  $37,3 \pm 5,02$  % et  $55,3 \pm 4,78$  %. La phagocytose augmentait avec l'activation immunitaire et variait entre  $62,5 \pm 4,31$  % et  $72,2 \pm 4,76$  % à  $0,1 \mu\text{g/mL}$  LPS et entre  $52,1 \pm 1,62$  % et  $68,3 \pm 3,21$  % à  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS. Aucune différence statistiquement significative entre le groupe témoin et les groupes de traitement n'a été observée pour tous les tests après 5 heures d'exposition sans, avec  $0,1 \mu\text{g/mL}$  ou  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS (pour les détails statistiques voir ANNEXE 4).

Aucune différence statistiquement significative dans la phagocytose entre les différentes concentrations d'IMI et le contrôle n'a été observée après 24 heures d'exposition et sans activation immunitaire. Les valeurs variaient entre  $84,07 \pm 2,15$  % et  $70,23 \pm 2,65$  %. Cependant, des différences entre les concentrations d'IMI ont été observées après l'activation immunitaire avec  $0,1 \mu\text{g/mL}$  ou  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS. Après activation avec  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de LPS et après 24 heures d'exposition à l'IMI, la phagocytose diminue dans les groupes traités par rapport au groupe témoin jusqu'à  $17,1$  %. Les baisses les plus importantes de phagocytose ont été observées à  $25 \mu\text{g/mL}$  et  $100 \mu\text{g/mL}$  IMI, ce qui a également été confirmé par des analyses statistiques (voir ANNEXE 4).  $81,33 \pm 1,43$  % des cellules du groupe témoin étaient capables de phagocyter au moins une bille de latex, alors que ce pourcentage diminuait avec l'augmentation des concentrations d'IMI, sauf pour les cellules à  $50 \mu\text{g/mL}$  IMI qui étaient capables de phagocyter plus de billes de latex que les cellules à  $25 \mu\text{g/mL}$  IMI. La phagocytose après 24 heures et l'activation ultérieure avec  $1 \mu\text{g/mL}$  LPS (Figure 23b) variait de  $81,21 \pm 4,69$

% dans le groupe témoin à  $67,2 \pm 4,99$  % à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IMI, ce qui était statistiquement différent du groupe témoin.



**Figure 23 : Phagocytose des cellules humaines THP-1 après (a) 5 heures et après (b) 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique.**

#### 4.2.4. Schneider 2 (*Drosophila melanogaster*)

Comme les cellules de drosophile constituent une lignée cellulaire continue, elles ont été utilisées pour mettre en place des conditions expérimentales pour les cellules d'abeilles et de bourdons. Nous avons donc essayé plusieurs scénarios avec des expositions différentes pour voir comment les cellules réagissaient. Nous présentons ici les résultats de deux scénarios d'exposition différents. Nous avons d'abord exposé les cellules pendant 5 ou 24 heures d'IMI, puis exposées à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS d'*Escherichia coli* pendant 16 heures. Dans un contexte expérimental différent, nous avons exposé des cellules à l'IMI et au LPS en même temps pendant 24 heures. Comme dans des conditions naturelles, les cellules immunitaires sont toujours en contact avec des agents pathogènes, il est plus probable qu'elles entrent en contact avec le pesticide après l'agent pathogène que l'inverse. Pour cette raison, nous avons



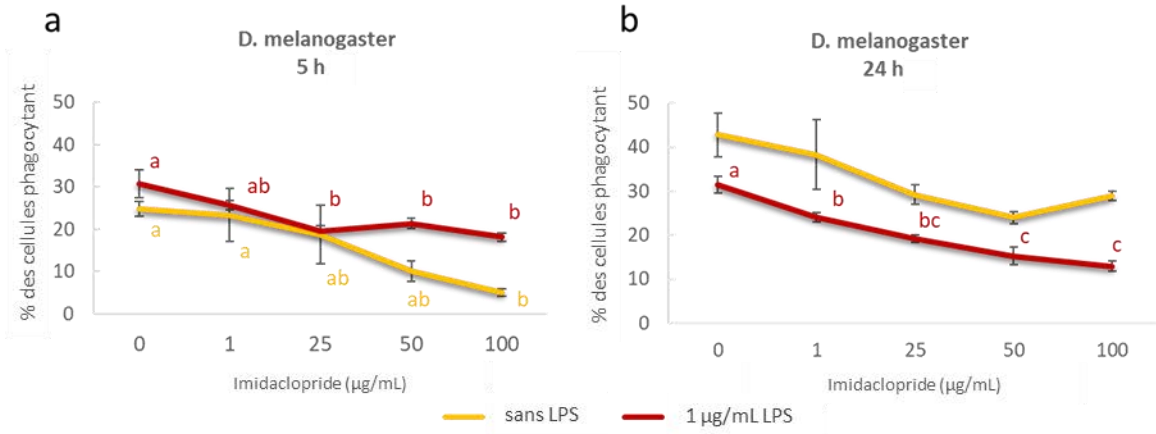
décidé d'exposer les hémocytes d'abeilles et de bourdons au pesticide et au LPS en même temps plutôt que de séparer les procédures d'exposition.

La phagocytose des Schneider 2 de *D. melanogaster* a été testée après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI avec ou sans activation immunitaire par 1 µg/mL LPS de *Escherichia coli*.

Après une exposition de courte durée de 5 heures, l'IMI a diminué le potentiel de phagocytose des cellules exposées de façon dose dépendante. Sans activation immunitaire,  $24,84 \pm 1,71$  % des cellules du groupe témoin ont pu phagocyter au moins une bille de latex. Les pourcentages ont diminué continuellement avec l'augmentation des concentrations de pesticides jusqu'à ce que la phagocytose n'atteigne que  $5,02 \pm 0,86$  % à la concentration d'IMI la plus élevée, ce qui était statistiquement significatif par rapport au témoin. Lorsque les cellules étaient activées par 1 µg/mL de LPS, nous avons constaté que la phagocytose dans les cellules diminuait significativement à 25 µg/mL d'IMI comparativement à son groupe témoin.

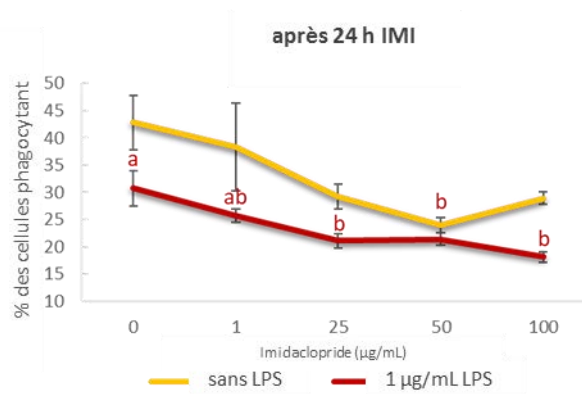
Après 24 heures d'exposition à l'IMI et aucune d'activation immunitaire, la phagocytose n'a varié que de  $42,90 \pm 4,99$  % dans le groupe témoin à  $27,85 \pm 1,38$  % après exposition à l'IMI, ne montrant aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes.

Après l'activation avec 1 µg/mL LPS pendant 16 heures et exposition de 24 heures à l'IMI, nous avons observé une diminution statistiquement significative de la phagocytose avec l'augmentation des concentrations de pesticides (pour les statistiques voir ANNEXE 4). Les valeurs variaient entre  $31,55 \pm 1,92$  % dans le groupe témoin et  $12,92 \pm 1,19$  % à la concentration d'IMI la plus élevée. À la plus faible concentration d'IMI utilisée de 1 µg/mL, seulement  $24,05 \pm 1,01$  % des cellules étaient capables de phagocytose, soit environ un quart de moins que dans le groupe témoin. À 25 µg/mL, la capacité de phagocytose a été réduite d'un tiers et, à 50 µg/mL, de plus de la moitié par rapport au témoin (Figure 24b).



**Figure 24 : Phagocytose des cellules Schneider 2 de la drosophile après (a) 5 heures et après (b) 24 heures d'exposition à l'IMI. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique.**

Que les cellules aient été exposées en même temps ou successivement à l'IMI et aux LPS pendant 24 heures, les résultats sont similaires. Comme auparavant, nous n'avons observé aucune différence statistiquement significative à aucune concentration d'IMI et sans LPS. En revanche, avec 1 µg/mL de LPS, nous avons observé une diminution significative de la phagocytose à 25 µg/mL d'IMI (Figure 25).



**Figure 25: Phagocytose des hémocytes de drosophile après 24 heures d'exposition à l'IMI et activation immunitaire simultanée avec le LPS. Les différentes lettres montrent des différences significatives entre les groupes IMI d'un même traitement PS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. Voir l'ANNEXE 4 pour les analyses statistiques.**

#### 4.2.5. Comparaison de la phagocytose chez les quatre espèces

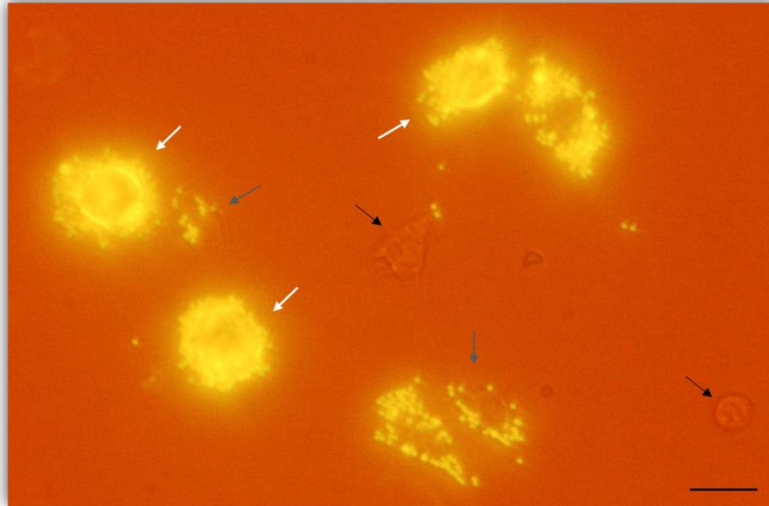
L'absorption et la digestion des pathogènes par phagocytose est une étape importante de la défense immunitaire (Kocks et al., 2005). Nos résultats montrent que l'IMI a eu un effet inhibiteur sur la phagocytose chez les quatre espèces. Alors que chez les macrophages humains, nous n'avons observé un impact sur la phagocytose qu'après 24 heures d'exposition, la diminution de la phagocytose est significative de façon dose dépendant à l'IMI dans les hémocytes des trois insectes après une exposition de courte durée de 5 heures. L'IMI a réduit de façon significative la phagocytose dans les hémocytes de drosophile après 5 heures à 25 µg/mL d'IMI lorsque l'immunité est stimulée. Dans les hémocytes d'abeilles, nous avons déjà trouvé un impact significatif sur 10 µg/mL d'IMI et dans les hémocytes de bourdons sur la plus faible concentration testée de 1 µg/mL d'IMI et avec LPS. Ainsi, en comparant l'activité phagocytaire des trois insectes, les hémocytes de bourdons se sont révélés plus sensibles à l'IMI que les hémocytes d'abeilles et de drosophiles. Cresswell et ses collaborateurs (2012) ont également déclaré que les bourdons sont plus sensibles à l'action de l'IMI que les abeilles domestiques. Ils ont présumé que la différence pouvait être trouvée dans la détoxification métabolique différente des deux espèces. La demi-vie de l'IMI chez les abeilles mellifères est de quatre heures (Suchail et al., 2004b) tandis que la demi-vie chez les bourdons a été établie à 10 heures (Cresswell et al., 2012). Le métabolisme de l'IMI chez la drosophile s'est révélé similaire à celui des abeilles. Ces indications doivent être prises en compte lors de l'analyse des tests de toxicité *in vitro*, car ces tests ne tiennent pas compte du processus métabolique *in vivo*. Dans notre étude, nous avons testé la phagocytose après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI. Le temps d'exposition a en effet joué un rôle dans le processus d'intoxication. Le temps d'exposition plus long a clairement renforcé les effets toxiques de l'IMI, les concentrations d'effet dans les hémocytes de bourdons et de drosophiles étant inférieures à 5 heures après l'exposition. La phagocytose dans les hémocytes de bourdons à la concentration la plus faible d'IMI a été réduite de plus de 50 % après 24 heures comparativement à 30 % après 5 heures. Après un temps d'exposition plus long, nous avons même constaté que la phagocytose était inhibée dans les THP-1 humaines alors qu'elles ne semblaient pas affectées pendant une exposition de courte durée. L'exposition de 24 heures n'a pas été testée sur des hémocytes

d'abeilles, car ils ont perdu leur adhérence à la surface du verre et ont été perdus pendant le processus de lavage. Les valeurs de la  $CE_{50}$  dépendent donc du type de cellules et de tissus, comme l'ont déjà supposé (Benzidane et al., 2011). La  $CE_{50}$  des cellules de Kenyon de l'abeille mellifère a été estimée à environ 6,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'IMI (Déglise et al., 2002). Comme l'IMI est un agoniste des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, les effets sur les cellules neuronales devraient être plus importants que sur les cellules du système immunitaire. Il n'est donc pas improbable que les effets sur les quatre types de cellules utilisés soient apparus à des concentrations plus élevées. De plus, nous avons observé une réduction de 50 % de la phagocytose dans les hémocytes de bourdons à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IMI après 24 heures d'exposition. L'IMI a déjà montré un effet sur les hémocytes des insectes même lorsque les cellules n'étaient pas stimulées par les LPS. *A contrario*, les effets sur les THP-1 ne se produisaient que si elles étaient exposées aux LPS et déclenchaient ainsi une réaction immunitaire. Étant donné que l'IMI est un insecticide, les insectes étant la cible principale, il est peu surprenant que les hémocytes d'insectes y réagissent de façon plus sensible que les THP-1 qui sont humaines. Cresswell et ses collaborateurs (2012) ont interprété dans leurs résultats que la température pourrait jouer un rôle pendant l'intoxication d'IMI chez les abeilles et les bourdons. Les Schneider 2 ainsi que les hémocytes d'abeilles et des bourdons ont été incubées à 22°C et les THP-1 à 37°C. Ces différences de température sont dues à des caractéristiques cellulaires différentes, mais il ne faut pas négliger le fait que cela peut jouer un rôle dans les processus d'intoxication des deux lignées cellulaires et des hémocytes d'abeilles recueillis. Aussi, Camp et Buchwalter (2016) et Song et al. (1997) ont constaté une toxicité chronique plus élevée de l'IMI chez les invertébrés aquatiques à basse température. Pourtant Van den Brink et al. (2016) ont montré que les populations estivales d'insectes aquatiques étaient plus touchées par l'IMI que les populations d'hiver. En effet, Linder et ses collaborateurs (2008) ont suggéré que des températures plus froides avaient des effets plutôt bénéfiques sur la réponse immunitaire de la drosophile, car les protéines du choc thermique peuvent améliorer la fonction immunitaire. Comme pour les macrophages humains, l'IMI n'a diminué la phagocytose de façon significative qu'après 24 heures d'exposition et à des concentrations d'IMI élevées avec 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS. Aucune altération significative de la phagocytose n'a été observée chez les macrophages après la courte période d'exposition de 5 heures avec ou sans activation

immunitaire. Plusieurs études ont montré une suppression dose-dépendante de la phagocytose des cellules de vertébrés par d'autres polluants (Bennasroune et al., 2012; Couleau et al., 2012; Dunier et al., 1991; Roszell and Anderson, 1994). Ceci suggère que les concentrations utilisées ne sont pas assez élevées pour provoquer des effets sur la phagocytose des THP-1 après une exposition de courte durée. Dans les THP-1, les LPS entraînent une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Chanput et al., 2014). Di Prisco et ses collaborateurs (2017) ont testé la clothianidine, un autre néonicotinoïde, sur la lignée cellulaire THP-1, montrant que le NF- $\kappa$ B était moins régulé par cet insecticide. Di Prisco et ses collaborateurs (2013) ont également constaté que la clothianidine a un effet négatif sur la signalisation du NF- $\kappa$ B dans la voie Toll de *Drosophila melanogaster* et *Apis mellifera*. La voie Toll joue à son tour un rôle important sur les réponses immunitaires, y compris l'activation de la phagocytose (Valanne et al., 2011). Cependant, la phagocytose n'est pas seulement activée par la voie Toll, mais aussi par la voie JAK/STAT (Evans et al., 2006). Ainsi, l'IMI pourrait réduire la phagocytose en inhibant plus d'une voie immunitaire qui active la phagocytose chez les hémocytes. En effet, Christen et ses collaborateurs (2016) ont découvert que l'IMI a régulé à la hausse la défensine-1, un peptide antimicrobien de la voie Toll chez les abeilles, en supposant que l'IMI pourrait plutôt agir par la voie JAK/STAT sur l'activité phagocytaire. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas tenu compte du nombre réel de billes ingérées par les cellules. Comme le montre la figure 26, les cellules ont pu engloutir de nombreuses billes, ce qui a rendu impossible le comptage de leur nombre réel. Nous avons cependant vu des cellules qui ont clairement ingéré moins de billes que d'autres lorsqu'elles ont été observées au microscope. Par conséquent, il est possible que notre méthode n'ait pas permis de détecter un effet de l'IMI sur l'efficacité de la phagocytose dans les THP-1 ou les Schneider 2. L'IMI pourrait influencer différents aspects du processus phagocytaire. Avec notre méthode, nous ne pouvons pas dire clairement si l'IMI peut influencer le taux d'absorption des bactéries ou la dégradation des bactéries une fois internalisées. Nous aurions ainsi pu passer à côté d'un effet inhibiteur graduel de l'IMI sur les quatre cellules testées. Afin de répondre à cette question nous avons fait la distinction entre les cellules qui ont phagocyté au moins une bille de latex et celles qui n'en ont pas phagocyté du tout. De plus, nous avons également compté toutes les cellules qui ont phagocyté moins de 20 billes, pour estimer si le Confidor vert affecte l'efficacité des cellules phagocytaires. Nous avons observé une

diminution significative de la phagocytose à 1 µg/mL d'IMI dans le Confidor vert sans activation immunitaire dans les hémocytes d'abeilles. Bien que les pourcentages de cellules phagocytant moins de 20 billes soient inférieurs aux pourcentages de cellules ayant phagocytées au moins une bille, nous avons observé une différence statistiquement significative que sur des concentrations élevées de Confidor vert. De plus, nous n'avons observé aucune différence entre les concentrations chez les bourdons pour la phagocytose totale ou avec moins des billes. Bien que Les hémocytes de bourdons semblaient réagir de façon plus sensible à l'IMI que les abeilles mellifères. Comme nous l'avons déjà mentionné au point 4.3.2, nous avons collecté des larves de bourdons jusqu'à la fin de l'automne. Contrairement à Linder et ses collaborateurs (2008) qui ont constaté que les températures plus froides amélioraient plutôt la réponse immunitaire des drosophiles, nous avons plutôt observé qu'avec les températures plus froides à la fin de l'automne, la condition immunitaire s'affaiblissait chez les larves de bourdons. Environ 20 % des hémocytes témoins étaient capables de phagocytose alors que dans d'autres expériences, plus de 60 % des hémocytes du groupe témoin étaient capables de phagocytose. Les résultats sur l'exposition du Confidor vert doivent donc être interprétés avec prudence.

Il a également été intéressant de constater lors de l'exposition au Confidor que les LPS n'ont pas du tout renforcé l'impact négatif de l'IMI. Bien que nous ayons clairement observé un effet additif des LPS sur l'action suppressive de l'IMI sur la réponse immunitaire phagocytaire des quatre cellules testées, aucun effet de ce type n'a été observé dans les hémocytes d'abeilles après exposition au Confidor vert.



**Figure 26 : Billes en latex fluorescent phagocytées par les cellules Schneider 2 de *D. melanogaster*. Les flèches blanches montrent les cellules qui ont englouti un grand nombre de billes, les flèches grises montrent les cellules qui ont englouti un petit nombre de billes et les flèches noires montrent les cellules qui n'ont pas phagocyté de billes fluorescentes en latex. La barre d'échelle est 10  $\mu\text{m}$ .**

En conclusion, nous pouvons résumer que des concentrations de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'IMI ont inhibé l'activité phagocytaire dans les macrophages humains et les hémocytes d'insectes après activation immunitaire par le LPS d'*Escherichia coli*. Les LPS ont clairement intensifié les effets inhibiteurs de l'IMI sur l'activité phagocytaire cellulaire. La phagocytose dans les hémocytes des insectes était plus fortement inhibée que dans les macrophages humains. Bien que nous n'ayons observé aucun effet de l'IMI sur la phagocytose des macrophages humains sans activation immunitaire, l'IMI a réduit la phagocytose de façon dose dépendante dans les cellules des insectes après même une courte exposition et sans activation immunitaire. Les cellules de bourdons ont été les plus touchées par l'IMI. Le Confidor vert a réduit la phagocytose dans les hémocytes d'abeilles à une concentration 10 fois inférieure à celle de l'IMI, mais ne semble pas augmenter son action suppressive avec l'augmentation des concentrations.

### 4.3. Production des ROS et NOS après l'exposition à l'IMI

Lorsque les cellules entrent en contact avec des agents pathogènes, elles produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces de l'oxygène d'azote (NOS) afin de tuer les microbes. Cette réaction immunitaire cellulaire est l'une des premières actions dans la défense contre les pathogènes. Comme ces molécules sont également toxiques pour l'organisme lui-même, il est important qu'elles restent en homéostasie. Il a déjà été démontré que « les produits chimiques » puissent modifier la production de ROS et de NOS entraînant un stress oxydatif chez les organismes. Par conséquent, nous avons mesuré la production de NO et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules après 30 minutes, deux heures puis après trois heures respectivement d'exposition à l'IMI et au Confidor vert avec et sans activation immunitaire.

#### 4.3.1. Hémocytes d'abeilles (*Apis mellifera*)

##### 4.3.1.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

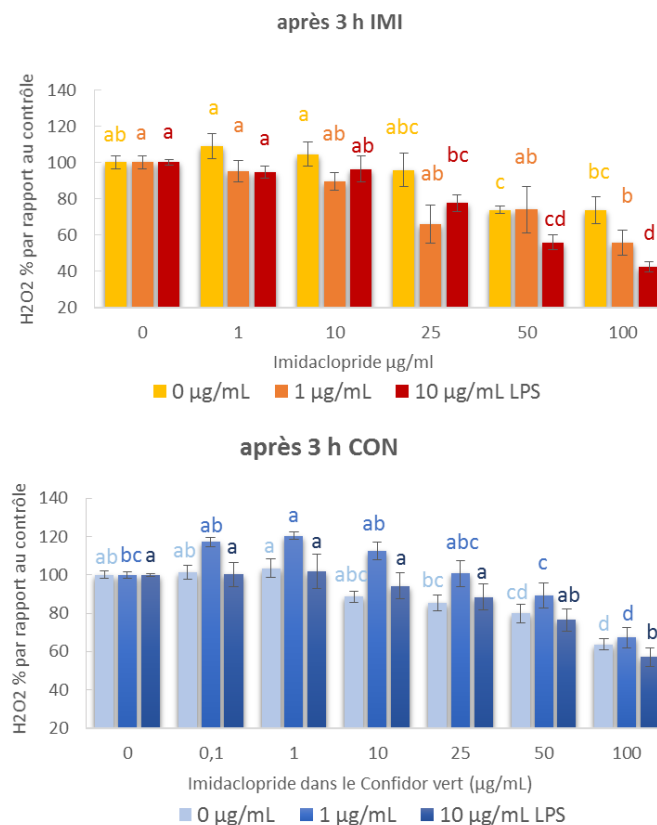
Du fait que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variait beaucoup d'une larve à l'autre, nous avons exposé les cellules d'une même larve aux différentes concentrations d'IMI et le même traitement par LPS. Ensuite nous avons calculé le pourcentage de variation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de chaque concentration d'IMI à son témoin négatif. En moyenne, les hémocytes du groupe témoin sans IMI et sans LPS ont produit 13,7 µM ± 4,5 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec un minimum et un maximum de 3,2 µM et 33 µM. Néanmoins nous avons trouvé le même profil d'augmentation ou de diminution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les différentes larves en fonction des différentes concentrations d'IMI. Nous avons également observé des concentrations plus élevées de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les témoins des traitements LPS plus élevés. Par exemple, nous avons trouvé une moyenne de 26,1 µM ± 6,3 µM après activation avec 10 µg/mL LPS.

Nous avons observé une légère augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à de faibles concentrations d'IMI (1 et 10 µg/mL) et une diminution significative de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 µg/mL d'IMI sans activation immunitaire, et nous n'avons pas observé d'augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lorsque les cellules étaient



activées immunitairement par les LPS mais plutôt une diminution (tests statistiques voir ANNEXE 4). Lors d'une faible activation immunitaire, l'IMI a entraîné une diminution significative à 100 µg/mL, tandis que lors d'un traitement élevé par LPS, elle a entraîné une diminution significative à 25 µg/mL, la production étant réduite de plus de 20 % à 25 µg/mL jusqu'à 57,7 % à la concentration maximale comparativement au groupe contrôle.

Après 3 heures d'exposition au Confidor vert, nous avons à nouveau observé une légère augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à de faibles concentrations d'IMI, avant de constater une diminution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à des concentrations plus élevées. Nous avons relevé une augmentation statistiquement significative à 1 µg/mL d'IMI et à une faible activation immunitaire, ainsi qu'une différence significative par rapport au témoin à 100 µg/mL d'IMI qui a été réduite de plus de 30 % par rapport au témoin (Figure 27).



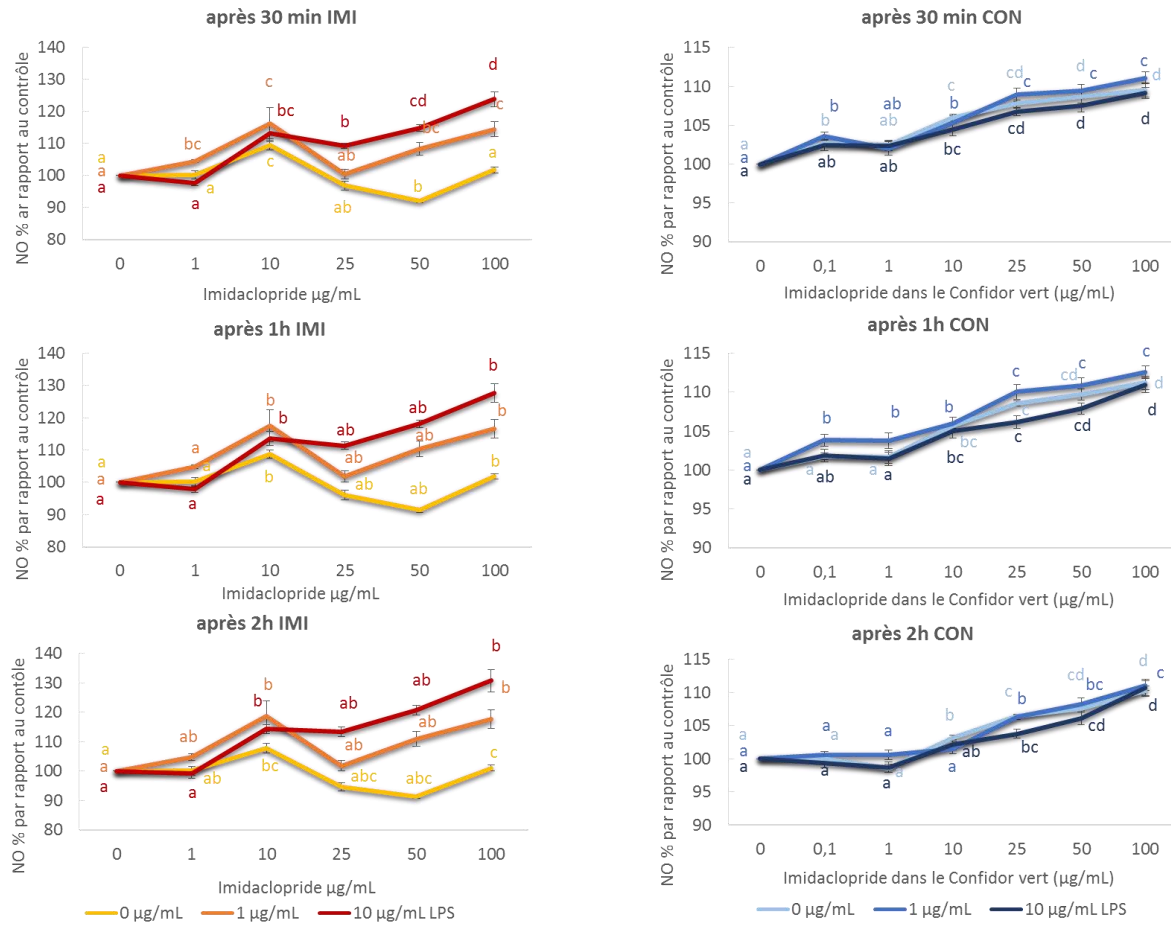
**Figure 27: Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les hémocytes d'abeilles après trois heures d'exposition à l'IMI (en couleur jaune/rouge) et au Confidor vert (en couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS (voir l'ANNEXE 5 pour plus des détails sur les tests statistiques).**

4.3.1.2. NO

Nous avons analysé le NO après 30 minutes, 1 heure et 2 heures d'exposition aux pesticides. Pour les hémocytes d'abeilles, nous n'avons pas observé de grande différence dans la libération intracellulaire de NO après les différents temps de mesure. La quantité de NO libérée a augmenté légèrement avec le temps, mais le rapport existant entre les différentes concentrations des pesticides sur le NO libérée dans les cellules par rapport à leur témoin (témoin négatif de chaque traitement au LPS) n'a pas beaucoup changé au fil du temps (voir la figure 28). Après l'exposition à l'IMI, nous avons constaté une augmentation significative de la libération de NO à 1 µg/mL d'IMI jusqu'à 10 µg/mL, suivie d'une diminution à 25 µg/mL et d'une augmentation de NO jusqu'à la concentration maximale utilisée de l'IMI. Cette tendance était à peu près la même pour les différentes activations de LPS, bien que l'augmentation de NO ait été plus forte après un traitement par les LPS.

À des concentrations d'IMI plus faibles (1 et 10 µg/mL), les hémocytes d'abeilles ont produit plus de NO lors d'une légère activation immunitaire que lors d'une activation immunitaire élevée. Nous avons constaté une augmentation statistiquement significative du NO par rapport à son groupe témoin pour 1 µg/mL d'IMI et une faible activation immunitaire. Par contre, la production du NO était la même que dans ses groupes témoins sans ou avec une activation immunitaire forte. À 10 µg/mL d'IMI, nous avons observé une augmentation maximale significative du NO dans les différents groupes de traitement LPS, par rapport au groupe témoin, avec une augmentation d'environ 15 % pour l'activation LPS et 7 % sans LPS. À 25 µg/mL d'IMI et avec une forte activation aux LPS, la libération de NO a légèrement diminué. Aux concentrations élevées d'IMI, le NO a ensuite augmenté dans tous les traitements LPS, les valeurs les plus élevées étant obtenues avec 10 µg/mL des LPS. Elle a augmenté de 1 %, 9 % et 15 % respectivement lors d'une légère activation immunitaire et de 11 %, 17 % et 27 % lors d'une forte activation immunitaire par rapport aux groupes témoins.

## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 28 : Production de NO dans les hémocytes d'abeilles après 30 minutes, 1 heure et deux heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement en LPS. (Pour plus d'informations sur les tests statistiques voir ANNEXE 6).**

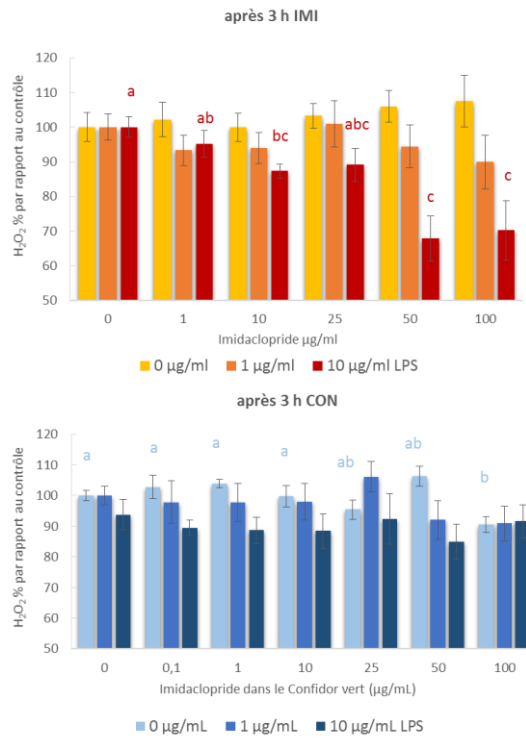
Contrairement à ce modèle d'augmentation et de diminution après exposition à l'IMI pure, nous avons observé une augmentation régulière de la libération de NO avec l'augmentation des concentrations d'IMI après exposition au Confidor vert (pour des analyses statistiques détaillées voir ANNEXE 6). Aucune différence importante n'a été observée entre les concentrations de NO des différents traitements par LPS (figure 28). Le NO a continuellement augmenté de 4 % par rapport à son témoin à la concentration d'essai la plus faible de 0,1 µg/mL jusqu'à ce qu'il dépasse 10 % à la concentration la plus élevée de Confidor vert testée. L'augmentation la plus élevée par rapport au témoin a donc été plus faible lors de l'exposition au Confidor vert que lors de l'exposition à l'IMI.

### 4.3.2. Hémocytes de bourdons (*Bombus terrestris*)

#### 4.3.2.1. $H_2O_2$

Comme expliqué au point 4.3.1.1, nous avons exposé les cellules d'une larve à toutes les concentrations d'IMI afin d'identifier l'impact de l'IMI sur le même individu. Aucune différence significative après 3 heures d'exposition n'a été détectée dans la production de peroxyde d'hydrogène des hémocytes de bourdons entre le groupe témoin et les cinq concentrations différentes d'IMI sans activation immunitaire et avec une faible dose de LPS (Figure 29, tests statistiques voir ANNEXE 5). Cependant, l'IMI a réduit de façon significative la production de peroxyde d'hydrogène des hémocytes de bourdons à des concentrations de 10 ; 50 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pendant une forte activation immunitaire avec 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS (pour des informations détaillées sur les analyses statistiques voir ANNEXE 5). Aux doses de 50 et 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la production de  $H_2O_2$  a été réduite de plus de 30 %.

Après 3 heures d'exposition au Confidor vert, nous avons constaté une diminution statistiquement significative de la production de  $H_2O_2$  sans activation par LPS et à la concentration d'IMI la plus élevée. Tous les autres scénarios n'ont pas montré de différences statistiquement significatives entre les concentrations d'IMI. Les concentrations de  $H_2O_2$  détectées dans les hémocytes de bourdons variaient entre 2 et 8  $\mu\text{M}$ , tandis que dans les hémocytes d'abeilles, elles atteignaient jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  chez certaines larves. Nous avons utilisé la même quantité d'hémolymphe dans les deux expériences, bien qu'en général nous ayons pu extraire plus d'hémolymphe des bourdons que des larves d'abeilles. Nous n'avons pas calculé la quantité d'hémocytes par  $\mu\text{L}$  de chaque larve utilisée lors des analyses de  $H_2O_2$ . Il se peut que nous ayons eu moins d'hémocytes chez les bourdons que chez les abeilles, ce qui s'est traduit par des concentrations de  $H_2O_2$  plus faibles, ou que les hémocytes des abeilles aient pu produire plus de  $H_2O_2$  que les bourdons.

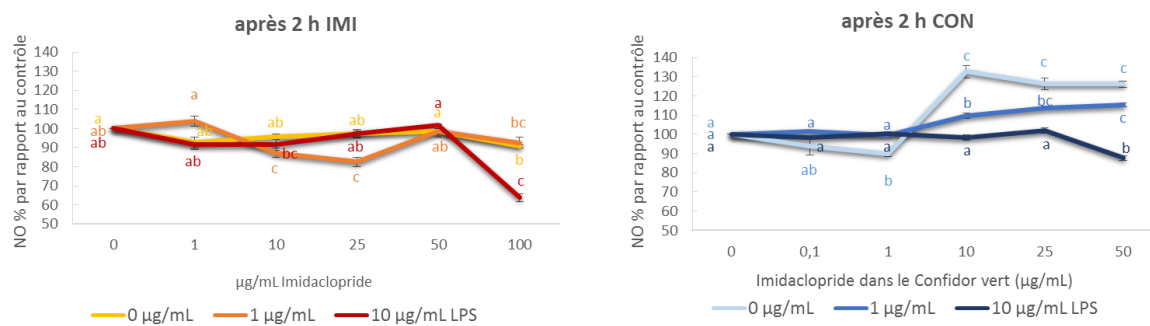


**Figure 29 : Production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des hémocytes de bourdon après 3 heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement en LPS. L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique. Pour plus d'informations sur les tests de statistiques voir ANNEXE 5.**

#### 4.3.2.2. NO

La libération d'oxyde nitrique a été mesurée après 15 minutes jusqu'à 4 heures dans les hémocytes de bourdons. Comme pour les hémocytes d'abeilles (voir point 4.3.1.2), nous avons constaté peu de différence dans la libération de NO pour différents temps de mesure. De nouveau, la quantité de NO libérée a augmenté avec le temps, mais la proportion de NO libérée dans les cellules de concentrations de pesticides différentes par rapport à son témoin (témoin négatif de chaque traitement aux LPS) n'a pas changé durant cette période. Par conséquent, les graphiques créés pour différents temps d'exposition se ressemblent tous. Nous avons donc décidé de ne discuter des résultats qu'après 2 heures d'exposition de l'IMI et du Confidor vert dans les hémocytes de bourdons.

L'IMI a légèrement réduit de 4 % la production d'oxyde d'azote dans les hémocytes de bourdons à 1 µg/mL, suivie d'une induction d'environ 5 % à 10 et 25 µg/mL et d'une réduction à des concentrations plus élevées du pesticide lorsque les cellules n'étaient pas immunisées (Figure 30). Alors qu'au cours d'une légère activation immunitaire, les concentrations de NO ont augmenté de 5 %, elles ont diminué de 10 % au cours d'une forte activation immunitaire à la plus faible concentration testée, soit 1 µg/mL. Cette diminution du NO a été observée à la fois pour les activations immunitaires à 10 et 25 µg/mL d'IMI. Les concentrations de NO ont augmenté de nouveau pour atteindre des niveaux témoins à 50 µg/mL d'IMI pour les deux activations immunitaires avant de chuter de nouveau à la concentration IMI la plus élevée de 100 µg/mL d'IMI.



**Figure 30: L'libération de NO dans les hémocytes de bourdon après 2 heures d'exposition à l'IMI (couleur jaune et rouge) et au Confidor vert (couleur bleu). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement en LPS. (Pour plus d'informations sur les tests de statistiques voir ANNEXE 6)**

### 4.3.3. Cellules humaines : THP-1

Contrairement aux cellules d'insectes nos protocoles expérimentaux non pas permis en évidence la libération de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.3.3.1. *NO*

Le NO a été mesuré dans des THP-1 après 15 minutes jusqu'à 2 heures après l'exposition à l'IMI ou au Confidor vert. Contrairement aux hémocytes d'abeilles et de bourdons, nous avons constaté une différence importante dans la libération de NO avec le temps. Après 30 minutes, nous avons mesuré les plus grandes différences d'émission de fluorescence dues au rejet de NO entre le groupe témoin et les différentes concentrations de pesticides. Cet écart de production de NO entre différents groupes diminuait continuellement avec le temps. Nous avons donc décidé d'évaluer trois temps différents plutôt que d'évaluer des données consolidées entre 15 minutes et 4 heures comme nous l'avons fait avec la production de NO chez les hémocytes d'abeilles et de bourdons (Walderdorff et al., 2018). Nous avons analysé la production de NO après 30 minutes, 1 heure et 2 heures d'exposition aux pesticides. Contrairement aux résultats des analyses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO dans les hémocytes de bourdons et d'abeilles, qui ont été calculées en pourcentage pour chaque larve (pour plus de détails voir 4.3.1.1), nous avons utilisé toutes les valeurs mesurées pour calculer une moyenne pour le groupe témoin.

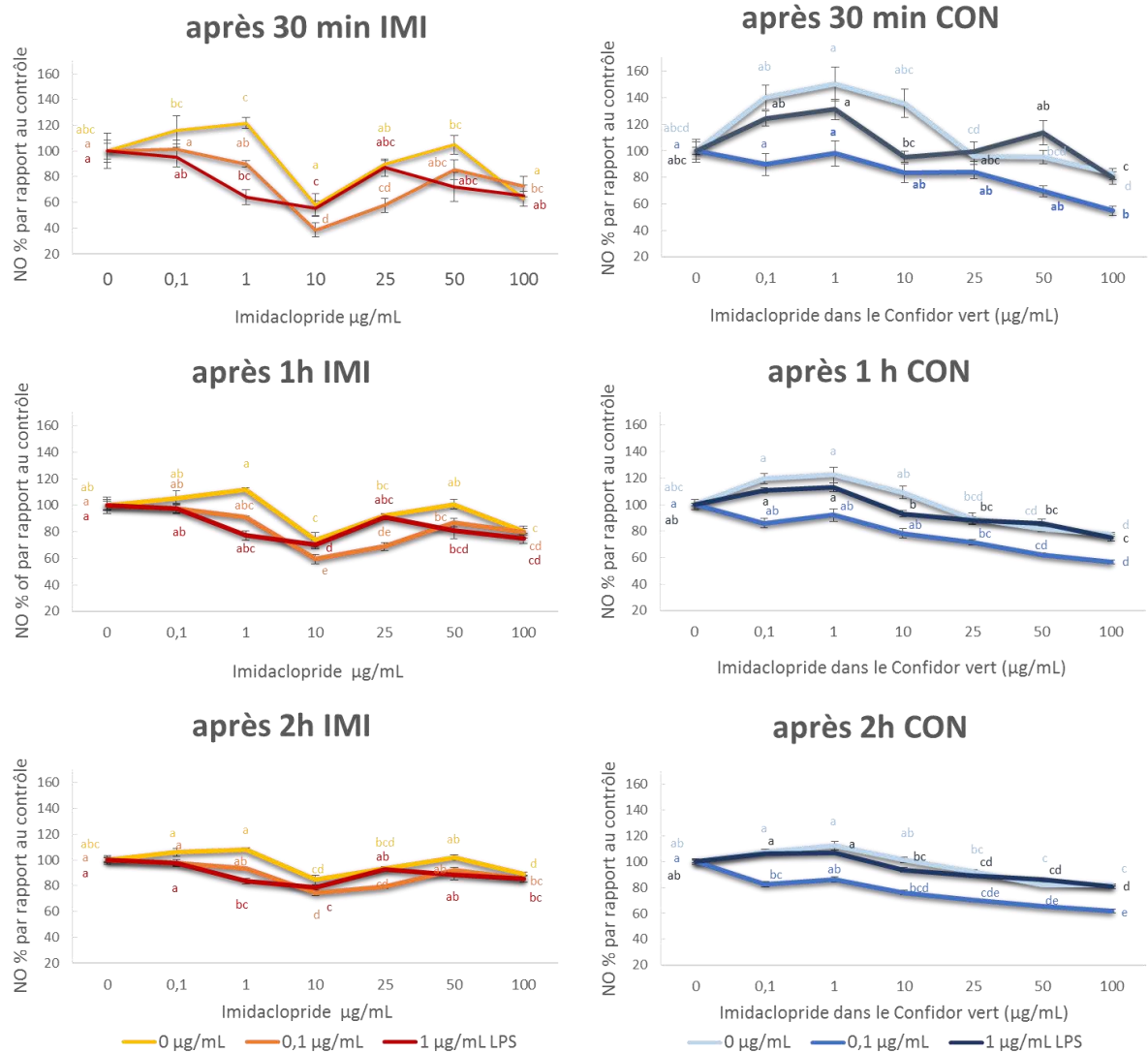
Comme le montre la figure 31, nous avons obtenu une réponse plus forte de NO aux deux pesticides après 30 minutes qu'après une exposition plus longue d'une heure ou deux heures. La production de NO a diminué avec le temps. Alors que nous avons observé une augmentation de 20 % du NO à 1 µg/mL IMI à 30 minutes sans activation par LPS, nous n'avons observé qu'environ 10 % d'une augmentation après 2 heures. Cet effet a été encore mieux observé après l'exposition au Confidor vert où l'augmentation de NO est de plus de 40 % pour le même groupe après 30 minutes et de seulement 10 % après 2 heures. En général, l'IMI et le Confidor vert ont conduit au même type de courbe dans la production de NO. Nous venons de trouver des réponses plus fortes des THP-1 au Confidor vert qu'à l'IMI. Dans les deux expériences (IMI et Confidor vert), nous avons observé la plus forte augmentation de NO après

une faible concentration sans activation immunitaire. Il semble donc que les pesticides entraînent un stress dans les cellules provoquant la libération de NO. Après une augmentation, nous avons observé une forte diminution du NO à 10 µg/mL d'IMI. Les quantités de NO tombent à environ 60 % en l'absence de LPS ou de LPS élevé, et à environ 40 % en cas de LPS faibles par rapport au groupe témoin, pour augmenter de nouveau à des concentrations d'IMI (à 25 µg/mL et 50 µg/mL) et ensuite diminuer de nouveau à 100 µg/mL. Pour le Confidor vert, nous observons une forte augmentation suivie d'une diminution continue de NO sans activation des LPS après 30 minutes. Plus l'exposition est longue, moins l'augmentation est marquée et moins il y a des variations avec le Confidor vert pour les trois groupes de traitement LPS (pour les analyses statistiques voir ANNEXE 6).

Certaines études ont montré que la mortalité des insectes augmentait avec de faibles doses, diminuait avec des doses intermédiaires et augmentait à nouveau avec des doses élevées. (Suchail et ses collaborateurs (2001) ont suggéré dans leurs travaux que ce profil de toxicité pourrait être attribuable à différents récepteurs d'affinité pour l'imidaclopride. De faibles doses pourraient activer un récepteur à haute affinité, tandis que des doses plus élevées pourraient activer les récepteurs à haute et à basse affinité. Ce qui peut conduire à une mortalité à faible dose et entraînant une action compensatrice à fortes concentrations induisant un effet protecteur. De tels sites de liaison à affinité élevée et faible ont été trouvés chez deux espèces d'Hemiptera (Lind et al., 1998). Lind et ses collaborateurs ont testé ces récepteurs d'affinité chez plusieurs espèces d'insectes dont la drosophile, mais n'ont pas mentionné les hyménoptères (famille des abeilles, des guêpes et des fourmis) dans leurs travaux. Chez les vertébrés, l'IMI semble également agir sur l'organisme longtemps après l'intoxication, ce qui en fait un composé à action prolongée.



## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 31 : Production de NO dans les THP-1 après 30 minutes, 1 heure et deux heures d'exposition à l'IMI ou au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 6 pour les p-values et les modèles statistiques.**

#### 4.3.4. Comparaison de la production cellulaire de ROS et NOS chez les différentes espèces

Les espèces réactives de l'oxygène comme le  $H_2O_2$  et le NO peuvent être nuisibles pendant le processus de réponse immunitaire. Le NO joue un rôle important dans les mécanismes de défense des insectes hôtes contre les virus, les bactéries et les parasites et est également produit en tant que molécule effectrice fonctionnant à la fois comme molécule de signalisation et comme composant cytotoxique (Rivero, 2006). Tafalla et ses collaborateurs (2003) ont suggéré que le NO pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la phagocytose chez les hémocytes de la mye (*Ruditapes decussatus*). Les deux molécules sont également importantes lors de la digestion des microbes phagocytés ou de l'encapsulation des parasites. L'efficacité de la phagocytose peut donc être encore plus affectée par l'IMI car les hémocytes sécrètent des radicaux d'oxygène et d'azote lors de la destruction des microbes internalisés.

Les hémocytes d'abeilles ont montré une plus forte sensibilité à l'IMI dans leur production de peroxyde d'hydrogène que les hémocytes de bourdons, car la production a diminué de façon significative à 50  $\mu\text{g/mL}$  d'IMI et aucune activation immunitaire et à 100  $\mu\text{g/mL}$  avec un faible traitement aux LPS (Figure 27). Comme pour les bourdons, l'IMI a eu un impact plus important sur les hémocytes d'abeilles lorsque l'exposition aux pesticides s'est produite avec une forte concentration en LPS, avec des différences significatives par rapport au témoin à 25  $\mu\text{g/mL}$  d'IMI (p-value voir ANNEXE 5). En effet, la production a diminué de plus de 20 % à 25  $\mu\text{g/mL}$  jusqu'à 57,7 % à la concentration d'IMI maximale comparativement au groupe contrôle. Chez les bourdons, nous avons observé une diminution d'environ 30 % de  $H_2O_2$  à des concentrations IMI élevées. Bien que l'IMI seul sans activation immunitaire n'ait eu aucun impact significatif à aucune concentration sur la production de  $H_2O_2$  chez les bourdons, il a été réduit dans les cellules d'abeilles à des concentrations très élevées. C'est surprenant, car les substances toxiques ont induit l' $H_2O_2$  dans les cellules immunitaires humaines en fonction du temps et de la dose, plutôt que de l'inhiber (Baulig et al., 2003; Klestadt et al., 2002; Qin, 2012). Malheureusement, nous ne pouvons pas comparer nos résultats à la production d' $H_2O_2$  dans les THP-1 car nous n'avons pu détecter aucun  $H_2O_2$  avec notre méthode à aucun traitement LPS dans ces cellules. Le Confidor vert semble avoir un effet plus faible sur la production de

peroxyde d'hydrogène chez les bourdons que pour l'IMI. Nous n'avons observé qu'une diminution de 10 % (contre 30 % lors de l'exposition à l'IMI) à la concentration maximale testée avec le Confidor vert. Chez l'abeille, nous avons observé à peu près les mêmes effets que lors de l'exposition à l'IMI, avec la seule différence que le Confidor vert avait une réponse inflammatoire à de faibles concentrations et faible traitement par LPS avec une augmentation de 20 % puis une diminution d' $H_2O_2$  à de fortes concentrations. Les LPS ont fait passer la réduction de  $H_2O_2$  observée par l'IMI de 30 % sans LPS à près de 60 % pendant une forte activation immunitaire.

Les résultats pour le NO ont montré l'effet contraire chez les abeilles, ce qui a entraîné une augmentation des émissions de NO. Il est intéressant de noter que les bourdons et les abeilles ont réagi complètement différemment à l'IMI lorsqu'ils ont été testés sur la production de NO. Bien que l'IMI ait légèrement augmenté le NO à des concentrations moyennes d'IMI sans activation immunitaire chez les bourdons, il a diminué en fonction de la dose d'IMI à une activation par LPS faible et élevée. Chez les abeilles, on observe une augmentation de NO en fonction de la dose d'IMI et des concentrations de LPS. Les LPS et l'IMI ont eu un impact additif significatif sur la production de NO. De plus, après l'exposition au Confidor vert, les cellules des deux pollinisateurs ont réagi différemment l'une de l'autre. Chez les abeilles, nous avons constaté une augmentation de NO comme nous l'avons constaté après l'exposition à l'IMI, sauf que nous n'avons plus observé de différence entre les différentes concentrations de LPS. De plus, l'augmentation due au Confidor était moins marquée que celle due à l'IMI pur. Cependant, chez les bourdons, le Confidor a montré un impact plus important sur la libération de NO, car nous avons observé une augmentation significative en l'absence de LPS et une diminution en cas de traitement aux LPS. Cresswell et al. (2012) ont présumé que la différence entre les deux pollinisateurs pouvait être liée à un métabolisme différent pendant le processus de la détoxication. Ce qui montre aussi que la demi-vie de l'IMI dans les deux espèces est différente, étant plus courte chez l'abeille que chez le bourdon (Cresswell et al., 2012; Suchail et al., 2004b).

Il a été démontré que le NO joue un rôle majeur dans le début de l'activation immunitaire des hémocytes d'abeilles pendant la reconnaissance et de la prolifération des hémocytes (Negri et al., 2013). De plus, il s'agit d'une réponse non spécifique omniprésente qui détruit les

pathogènes donc pertinente dans le processus de la phagocytose. Cependant, ces caractéristiques cytotoxiques peuvent également nuire à l'organisme lui-même, car une sécrétion élevée de NO entraîne un stress oxydatif dans les cellules (Rivero, 2006). Bien que le NO agisse comme inducteur de la réponse immunitaire dans les phagocytes, de grandes quantités de NO produites par les hémocytes peuvent déclencher l'apoptose dans les cellules voisines. Il est donc essentiel de maintenir son homéostasie.

Fait intéressant, nous avons observé un impact plus important de l'IMI sur la production humaine de NO que dans les hémocytes d'abeilles et de bourdons. Par contre la phagocytose a été nettement plus touchée dans les cellules d'insectes que dans les cellules humaines. De plus, nous avons observé un impact plus important du Confidor vert sur la libération de NO cellulaire humaine qu'après une exposition à l'IMI. L'IMI à faibles concentrations a entraîné une forte augmentation de NO puis une diminution à des concentrations plus élevées. L'IMI a donc montré des effets agonistes et antagonistes à des concentrations élevées et faibles. L'IMI a également causé du stress oxydatif chez la carpe et le rat, montrant une augmentation de NO dans les tissus et une régulation accrue de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase ; Duzguner and Erdogan, 2012; Özdemir et al., 2018). Nous avons également observé que le rejet de NO était le plus fortement impacté après la courte exposition de 30 minutes et s'est stabilisé après une exposition plus longue (1 heure et 2 heures). Au contraire, nous n'avons pas trouvé un effet aussi fort du temps d'exposition sur les hémocytes des insectes. Il semble logique que la libération de NO soit la plus forte après une exposition de courte durée car c'est la première réaction rapide des cellules à la reconnaissance des pathogènes. En raison de leur mode de vie, les abeilles sont exposées à des charges croissantes de stress oxydatif car le nectar, le pollen et la propolis contiennent des substances allélochimiques qui produisent des espèces réactives oxygénées. Les ROS et les NOS ne sont pas seulement toxiques pour les microbes, mais aussi pour les cellules d'abeilles. Elles ont donc développé un système enzymatique antioxydant très efficace pour éliminer les radicaux libres d'oxygène (Korayem et al., 2012). L'IMI pourrait activer ce système enzymatique, ce qui entraînerait une diminution de ROS et de NOS à fortes concentrations. Le fait d'avoir ce système enzymatique très évolué pourrait également expliquer que nous n'avons pas observé de différence importante entre les temps d'exposition plus longs dans les cellules des deux insectes.

#### 4.4. Protéines participant à la réponse immunitaire

La reconnaissance des agents pathogènes ou l'activation des cytokines déclenche une cascade de protéines dans les cellules pour transmettre le signal de la paroi cellulaire au noyau, afin de commencer la transcription des molécules de signalisation ou autres réactions immunitaires. Comme il existe plusieurs voies immunitaires différentes connues pour jouer un rôle dans la réponse immunitaire, nous avons étudié l'impact de l'IMI et du Confidor vert sur plusieurs protéines différentes impliquées dans ces voies de transcription. Chez les abeilles et les bourdons, nous avons examiné par qPCR l'expression de gènes de diverses protéines impliquées dans les réponses immunitaires après exposition simultanée aux pesticides et aux LPS. Dans des THP-1, nous avons effectué un test ELISA pour détecter la quantité de cytokines libérées après une réaction immunitaire.

##### 4.4.1. Hémocytes d'abeilles (*Apis mellifera*)

Chez les abeilles, nous avons étudié l'expression génétique relative de six protéines après 18 heures d'exposition à l'IMI ou au Confidor vert avec ou sans activation immunitaire par LPS. Nous avons cherché au moins une protéine de chaque voie pour voir si les voies d'exposition sont affectées différemment par les pesticides. Alors que la protéine « basket » fait partie de la voie JNK, « relish » fait partie de la voie Imd, « TEP-A » de JAK/STAT et « Spätzle », « myd88 » et « défensine » font partie de la voie activée par les récepteurs Toll.

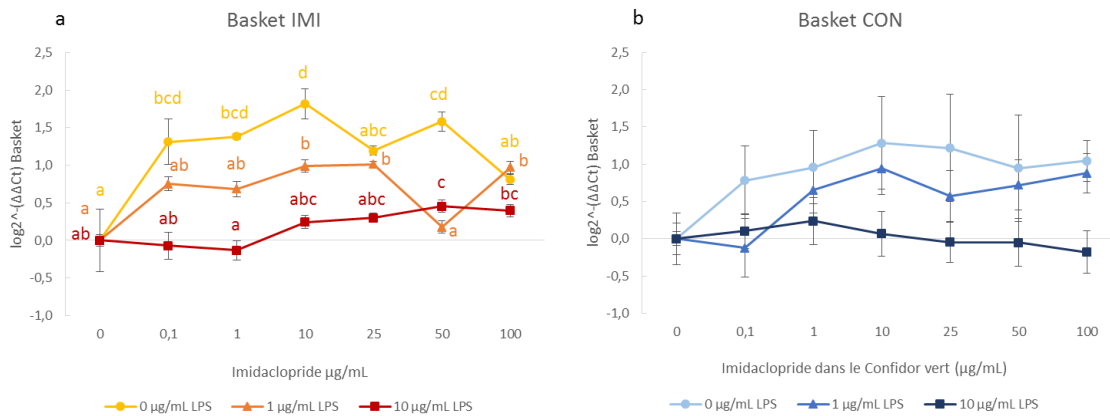
##### 4.4.1.1. Voie JNK : basket

Basket, un gène de signalisation de la voie immunitaire JNK, a été significativement régulé à la hausse par l'IMI à la plus faible concentration testée soit 0,1 µg/mL sans traitement LPS (Figure 32). Cette régulation était plus forte et dose dépendante par rapport à l'IMI atteignant

un maximum d'environ 80 fois l'expression du groupe témoin sans IMI, pour 10 µg/mL d'IMI. À 25, 50 et 100 µg/mL d'IMI, l'expression a diminué, mais « basket » était encore fortement surexprimé par rapport à son groupe témoin. Après activation immunitaire avec 1 µg/mL de LPS, nous avons à nouveau observé une surexpression par rapport au groupe témoin, mais cette fois les différences entre l'expression des gènes dans le groupe témoin et dans les groupes de traitement IMI n'étaient pas si importantes que sans LPS (10 fois plus que dans le groupe témoin, Figure 32). À 1 µg/mL de LPS, nous avons observé une hausse statistiquement significative de l'expression pour 10 µg/mL d'IMI, tandis qu'à 10 µg/mL LPS, la hausse de l'expression n'était significative qu'à partir de 50 µg/mL d'IMI (trois fois plus importante que chez le témoin, voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques). Basket est une protéine de signalisation et est régulée à la hausse chez la drosophile dans les 5 premières minutes après une infection, bien qu'après une heure aucune augmentation ne soit détectable (Sluss 1996). L'IMI seul déclenche l'expression de « basket » comme si les cellules étaient activées par le système immunitaire. Lorsque les cellules réagissent aux LPS, l'IMI a un effet additif sur l'expression des gènes de « basket », mais comme nous observons déjà une expression génétique plus élevée dans le contrôle due aux LPS, la différence d'expression entre le contrôle LPS et les groupes d'IMI est inférieur à celui entre le contrôle sans LPS et les groupes d'IMI. Les LPS seuls sans pesticide ont entraîné une augmentation de 3,5 et 8,3 fois l'expression de « basket » pour 1 et 10 µg/mL LPS respectivement par rapport à son contrôle sans LPS. L'IMI seul (sans LPS) a donc eu un impact dix fois plus important sur l'expression de « basket » (80 fois plus important) dans les cellules d'abeilles qu'une activation immunitaire par les LPS.

Nous avons observé le même effet lorsque les hémocytes d'abeilles ont été exposés au Confidor vert. Le Confidor vert régule « basket » à la hausse à 0,1 µg/mL d'IMI sans activation immunitaire. Même si nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative entre les concentrations de pesticides, le gène était exprimé 45 fois plus fortement après exposition au Confidor vert que dans son groupe témoin. Une régulation à la hausse forte mais plus légère par le Confidor vert a également été observée après activation immunitaire avec 1 µg/mL LPS (13 fois, voir Figure 32). Erler et ses collaborateurs (2011) ont testé l'expression génétique de « basket » chez les bourdons après une activation immunitaire et ont constaté

que « basket » était moins exprimé après une infection qu’après une blessure, ce qui suggère que l’infection par *E. coli* entraîne une régulation négative de la voie JNK supérieure à celle de la blessure. D’autre part, Evans et ses collaborateurs (2006) ont constaté que « basket » n’était pas fortement touché après une injection bactérienne ou une blessure.

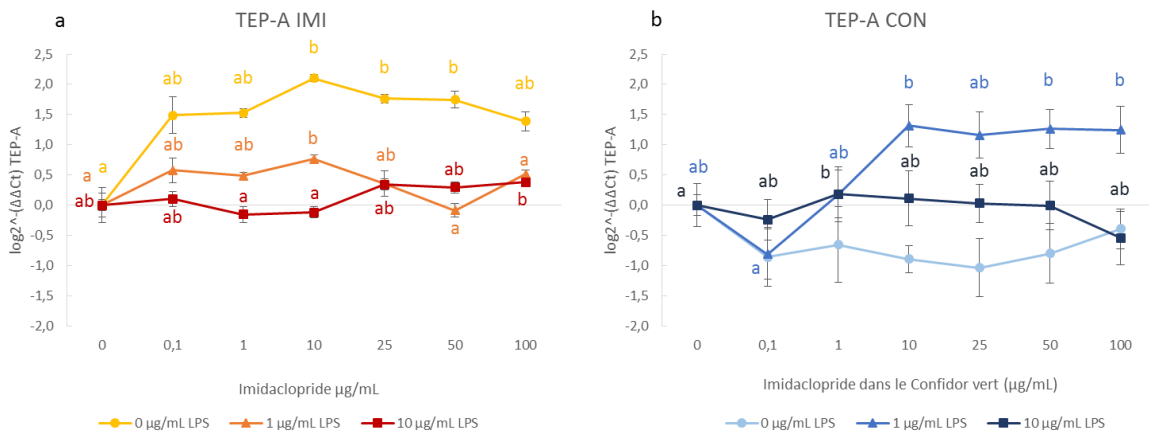


**Figure 32 : L'expression relative de « basket » après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement en LPS (tests statistiques voir ANNEXE 7).**

#### 4.4.1.2. Voie JAK/STAT : TEP-A

Comme nous l'avons déjà vu pour l'expression génétique de « basket », nous avons constaté une forte surexpression (9 fois le contrôle) du TEP-A à notre plus faible concentration d'IMI (0,1 μg/mL). L'expression augmente de 45 fois lorsque la concentration passe à 10 μg/mL d'IMI puis diminue de 9 par rapport au contrôle pour 100 μg/mL (Figure 33). Après une faible activation immunitaire avec 1 μg/mL LPS, l'IMI a augmenté significativement l'expression du TEP-A pour 10 μg/mL d'IMI. On retrouve la même tendance dans l'expression TEP-A après 1 μg/mL LPS que sans LPS, mais avec des différences plus faibles entre le témoin et les concentrations d'IMI. Après forte activation immunitaire (10 μg/mL LPS), l'IMI a significativement augmenté l'expression du TEP-A pour la concentration la plus élevée de l'IMI (100 μg/mL).

TEP-A est une protéine effectrice libérée après la voie de transcription JAK/STAT. Il est intéressant de noter que Evans et al. (2006) n'ont trouvé aucun changement pertinent dans son expression après une exposition bactérienne ou une blessure chez des abeilles adultes ou des larves. Cependant, les gènes effecteurs de la voie Toll, comme l'abaecine ou la défensine, étaient fortement régulés à la hausse chez les abeilles adultes lors d'une activation immunitaire. Nous n'avons observé aucun changement pertinent dans l'expression génétique du TEP-A après 1 µg/mL de LPS et une régulation à la hausse de 3,2 fois après une forte activation immunitaire (10 µg/mL de LPS) dans les groupes témoins sans pesticides. La régulation à la hausse du TEP-A par l'IMI (changement de 9 à 45 fois) est donc très importante dans les cellules non immunisées. Cependant, en comparant les résultats de la molécule pure à son produit commercial, nous n'avons trouvé une régulation positive significative du TEP-A par le Confidor vert que lorsque les cellules étaient immunisées avec 1 µg/mL de LPS (changement 67 fois supérieur à 10 µg/mL d'IMI de Confidor vert). Le TEP-A semble être assez peu régulé par le Confidor vert (0,12 fois moins) lorsque les cellules n'ont pas été exposées au LPS, bien que nous n'ayons pas trouvé de différences statistiquement significatives entre le témoin et toutes les concentrations de Confidor vert sans LPS testées (Figure 33b).

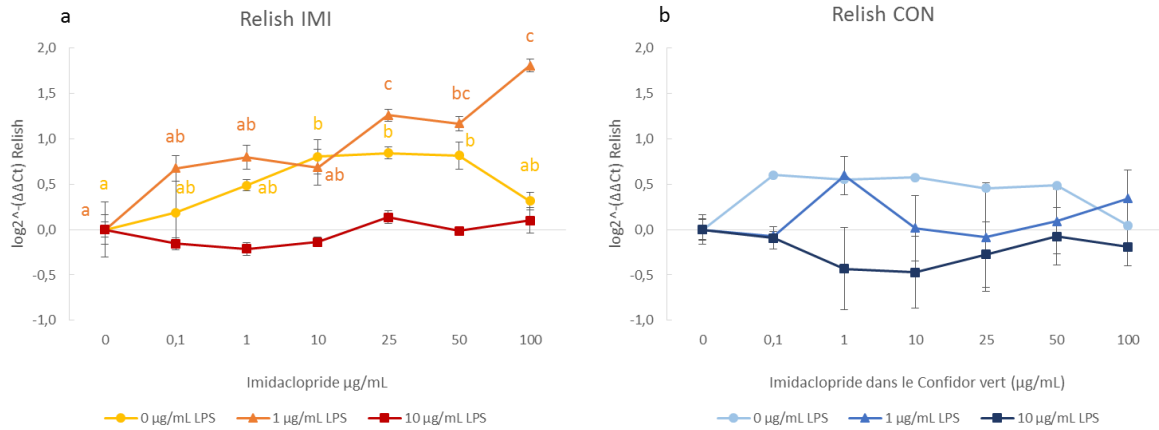


**Figure 33 : L'expression relative du gène TEP-A après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques).**



4.4.1.3. *Voie Imd : Relish*

Relish est le principal facteur de transcription de la voie Imd, qui conduit à la transcription des protéines effectrices antimicrobiennes et à la mélanisation. Chez les abeilles, elle est régulée à la hausse en cas d'infection bactérienne et de blessure. Son expression varie en fonction du défi immunitaire et de l'agent pathogène. Par exemple, Lourenço et al. (2013) ont trouvé que relish était plus fortement régulée après un défi immunitaire avec des bactéries Gram-négatives qu'après un défi avec des bactéries Gram-positives ou après une blessure. Après 18 heures d'exposition à l'IMI, nous avons observé une augmentation significative de son expression pour une variation de 10 µg/mL à 50 µg/mL d'IMI, puis une diminution pour 100 µg/mL d'IMI. Néanmoins, avec l'activation à 1 µg/mL de LPS, l'expression de relish augmente de façon dose dépendante atteignant un maximum à 100 µg/mL d'IMI, de 66 fois plus que son contrôle sans l'IMI (Figure 34a). Lors d'une activation immunitaire plus forte (10 µg/mL de LPS), l'IMI n'a pas changé l'expression de relish. Lorsque les cellules ont été exposées au Confidor vert sans LPS, nous avons observé un schéma d'expression similaire à celui observé après une exposition à l'IMI. L'expression était régulée à la hausse aux concentrations faibles et intermédiaires et diminuait à des valeurs similaires à celles des témoins pour 100 µg/mL de Confidor vert. Néanmoins, nous n'avons trouvé aucune différence statistiquement significative pour aucune concentration de pesticide testée avec ou sans LPS. En comparant les trois groupes témoins sans pesticides et les différentes concentrations de LPS, nous avons constaté une régulation à la hausse de l'expression de relish avec des concentrations plus élevées de LPS (changement de 3,6 fois pour 10 µg/mL LPS).



**Figure 34 : L'expression relative du gène relish après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques).**

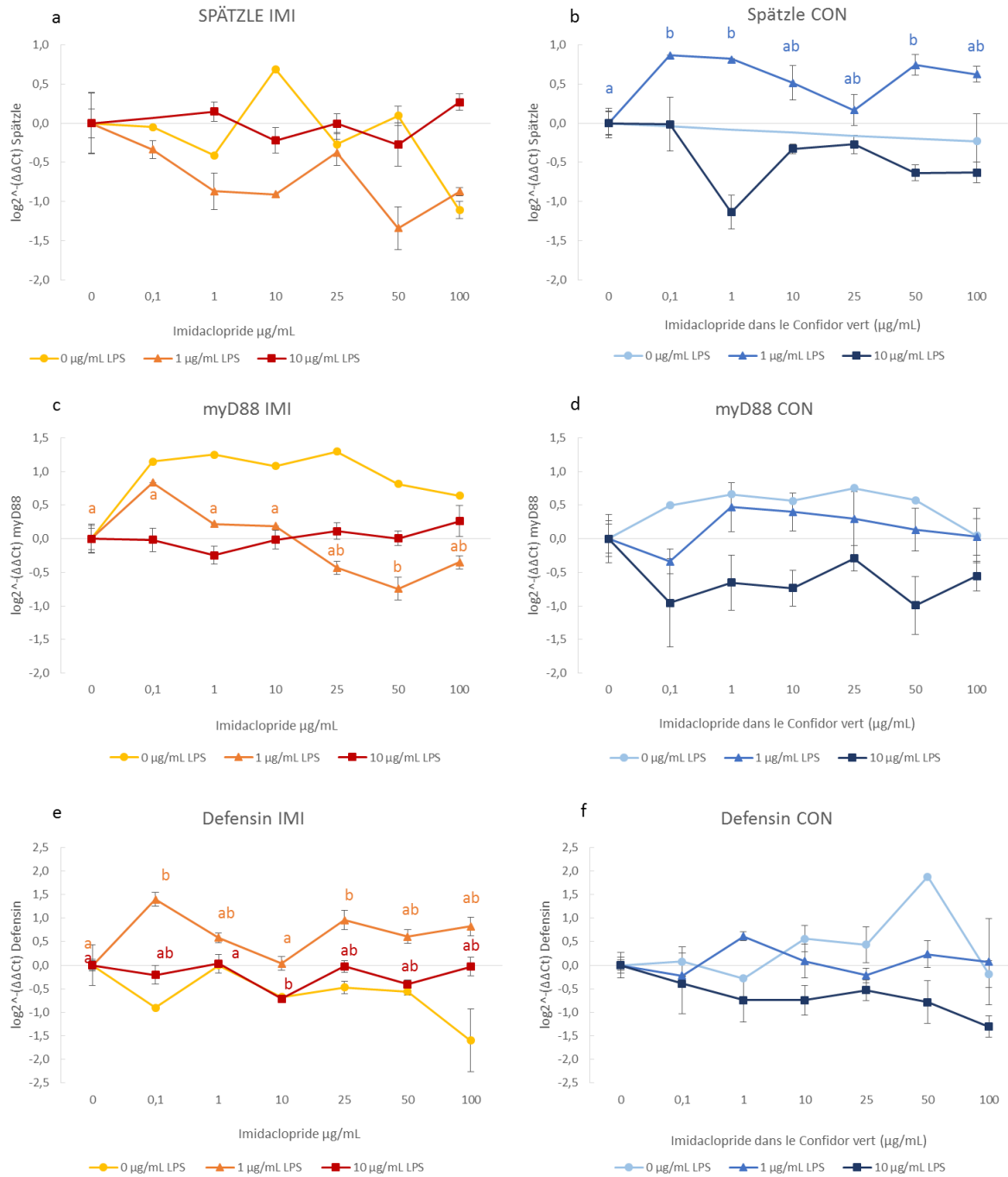
#### 4.4.1.4. Voie Toll: Spätzle, myD88 et défense

Les trois protéines Spätzle, myD88 et la défense représentent la voie de signalisation Toll. Spätzle est une protéine de signalisation, comme une cytokine, qui active la voie Toll ; myD88 est un facteur transcriptionnel et la défense une protéine effectrice, libérée pour inactiver les bactéries.

Alors que Spätzle est régulé à la baisse avec les concentrations d'IMI les plus élevées après activation avec 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, nous avons constaté une augmentation significative de son expression après exposition au Confidor vert et 1  $\mu\text{g/mL}$  de LPS (Figure 35a,b). Tesovnik et al. (2017) ont testé l'impact du thiametoxam, un autre néonicotinoïde, sur la réponse immunitaire des nymphes infestées par les acariens Verroa. Au début de la nymphose (yeux blancs), le néonicotinoïde a entraîné une régulation descendante du Spätzle et de la défense, tandis que chez les nymphes plus âgées (yeux bruns), Spätzle était régulé vers le haut. Sans LPS ou avec 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS, ni l'IMI ni le Confidor vert ne semblent affecter l'expression de cette protéine de signalisation. Les LPS seuls, sans pesticide, ont entraîné une réduction de la régulation de 0,4 ou 0,8 fois pour 1  $\mu\text{g/mL}$  ou 10  $\mu\text{g/mL}$  de LPS respectivement. Au contraire, Evans et ses collaborateurs (2006) ont montré que Spätzle et myD88 ainsi que

la défensine étaient régulés à la hausse chez les larves d'abeilles lors d'un défi immunitaire. Cependant, dans nos expériences, seule la défensine a été régulée à la hausse par les LPS dans les groupes témoins sans pesticides (Figure 35e,f). MyD88 n'a montré aucun changement important dans son expression après 1 ou 10 µg/mL de LPS dans les groupes témoins. MyD88 interagit avec Toll, Tube et la Pelle kinase et possède le motif TIR (Toll/interleukin-1 receptor-like motif) conservé et un autre motif du domaine de la mort (Schlüns et al., 2010). Nous avons toutefois constaté une régulation à la hausse de myD88 lorsque les cellules n'étaient pas activées par l'immunité et exposées à l'IMI ou au Confidor vert. Avec des concentrations de LPS élevées ou faibles, l'expression de myD88 n'a pas changé ou était moins régulée par rapport à son contrôle sans pesticides. Nous avons tout de même constaté une légère régulation à la hausse de la défensine lorsque les hémocytes étaient exposés à 1 µg/mL de LPS et d'IMI. Il semble qu'il pourrait y avoir une boucle d'affection négative où l'expression de Spätzle serait réduite avec l'augmentation de l'expression de la défensine. Globalement, l'IMI et le Confidor vert n'ont montré qu'un léger impact sur la voie Toll par rapport aux résultats des autres voies immunitaires Imd, JNK et JAK/STAT.

## RESULTATS ET DISCUSSION



**Figure 35:** L'expression relative des gènes Spätzle (a,b), myD88 (c,d) et défensine (e,f) après 18 heures d'exposition à l'IMI (couleurs jaunes) et au Confidor vert (couleurs bleus). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor vert pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 7 pour les tests statistiques).

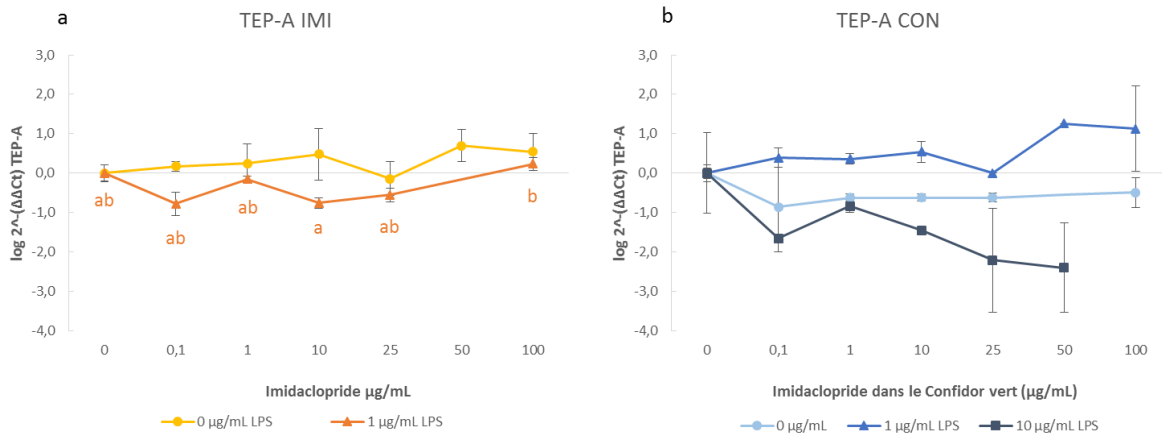
#### 4.4.2. Hémocytes de bourdons (*Bombus terrestris*)

Nous avons testé l'expression génétique relative de 3 protéines différentes sur des cellules de larves de bourdons après 18 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert. Nous avons utilisé des amorces pour les gènes TEP-A, relish et défensine, représentatives des voies immunitaires JAK/STAT, Imd et Toll. Contrairement aux larves d'abeilles, les larves de bourdons étaient assez limitées en tant que ressource (des milliers d'abeilles/ruche contre 60 bourdons/ruche). Pour avoir une quantité suffisante d'ARN et suffisamment de répétitions, les analyses qPCR ont nécessité un nombre élevé de larves. À l'exception de l'exposition au TEP-A et au Confidor vert, les résultats ne montrent pas d'activation immunitaire avec 10 µg/mL LPS, car nous n'avons pas un nombre suffisant de répétitions pour avoir des données représentatives. Il serait donc en effet nécessaire de répéter ces expérimentations sur une autre saison avec un nombre beaucoup plus conséquent de ruches et donc de larves.

##### 4.4.2.1. *Voie JAK/STAT : TEP-A*

Dans les groupes témoins sans pesticides, l'expression du TEP-A chez les bourdons était régulée à la baisse (0,8 fois plus) lorsque les cellules étaient soumises à 1 µg/mL de LPS ou sans LPS. Cette constatation est conforme à la littérature. D'autres études ont également révélé que la blessure et l'injection de bactéries ont entraîné une baisse de la régulation du TEP-A chez les bourdons (Barribeau and Schmid-Hempel, 2013; Erler et al., 2011). Contrairement aux abeilles, où nous avons observé une régulation à la hausse lors de l'exposition aux pesticides, l'expression du TEP-A dans les hémocytes de bourdons n'a pas changé ou était légèrement réduite après 18 heures d'exposition à l'IMI avec 1 µg/mL de LPS ou sans LPS (Figure 36a). Nous avons observé des résultats similaires après exposition à son produit commercial, le Confidor vert. En cas d'activation immunitaire ou sans, le TEP-A n'a pas modifié son expression, tandis qu'en cas d'activation immunitaire élevée (10 µg/mL de LPS), l'expression du TEP-A était réduite d'un dixième à 50 µg/mL de Confidor vert par rapport à son groupe témoin sans pesticide (Figure 36b). Nous n'avons toutefois trouvé aucune différence

statistiquement significative à aucune concentration de pesticide testée pour tous les tests avec le Confidor vert (ANNEXE 8).

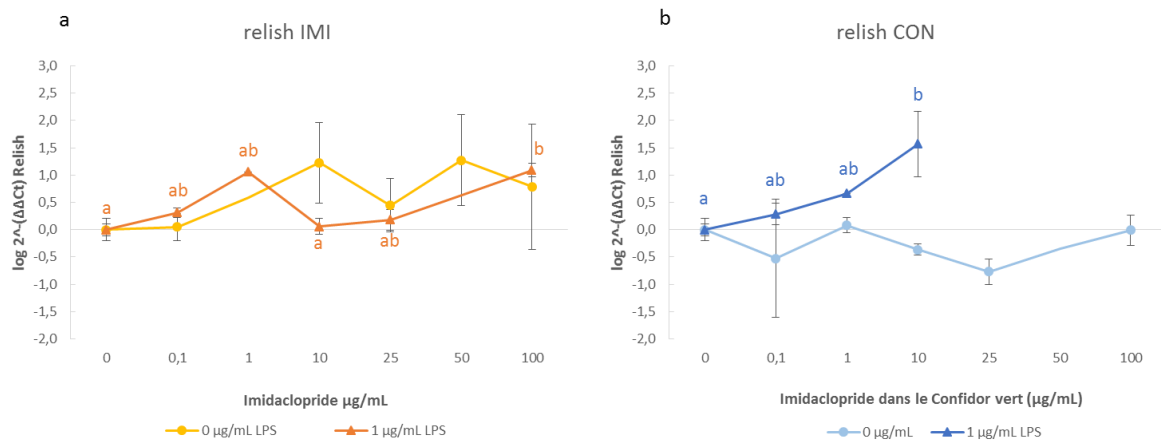


**Figure 36: L'expression relative du gène TEP-A dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 8 pour les tests statistiques).**

#### 4.4.2.2. Voie Imd : relish

L'activation immunitaire avec 1  $\mu\text{g/mL}$  LPS n'a pas conduit à une régulation à la hausse de l'expression génétique de « relish » chez les bourdons après 18 heures d'exposition, bien que nous ayons observé une régulation à la hausse après activation par LPS chez les abeilles. Cependant, l'expression de relish chez les bourdons était assez semblable à celle des abeilles en ce qui concerne l'impact d'IMI et du Confidor vert. Sans et avec 1  $\mu\text{g/mL}$  des LPS, relish est régulé à la hausse avec des concentrations d'IMI élevées (Figure 37). Il est plus fortement régulé à la hausse avec 1  $\mu\text{g/mL}$  des LPS que sans LPS. Le Confidor vert a montré des effets similaires sur l'expression du gène relish. Nous avons constaté une augmentation significative de la régulation à 10  $\mu\text{g/mL}$  de Confidor vert, lorsque les cellules sont activées avec 1  $\mu\text{g/mL}$  des LPS. Relish est fortement exprimée chez les bourdons immédiatement après l'infection, mais il est soumis à un contrôle négatif par rapport à l'expression de l'AMP, il est ainsi moins fortement exprimé avec le temps (Erler et al., 2011). Nous n'avons étudié son expression

qu'après 18 heures, bien que l'expression ait déjà pu être réduite. De plus, Schlüns et al. (2010) ont constaté que l'expression de relish après l'infection montrait des différences importantes non seulement entre les bourdons de colonies différentes, mais même entre les travailleurs d'une même ruche, bien que les bourdons de la même ruche soient très proches et génotypiquement très semblables. Bien que les réponses à l'infection, en termes d'expression de relish, diffèrent entre les unités génotypiques représentées par les colonies, les peptides antimicrobiens appartenant vraisemblablement à la voie Imd étaient régulés à la hausse dans toutes les colonies après une infection par un pathogène du bourdon (Schlüns et al., 2010).

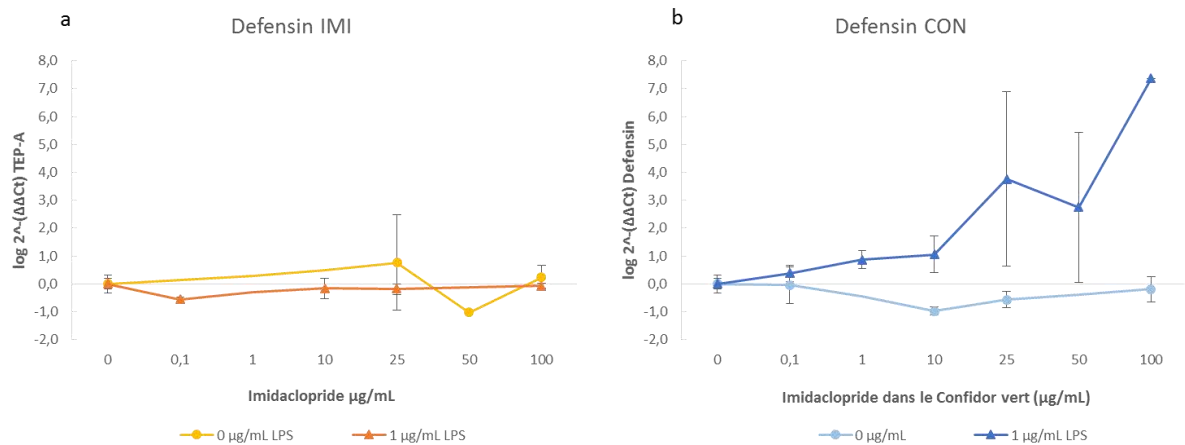


**Figure 37: L'expression relative du gène relish dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI pour un même traitement par LPS (voir ANNEXE 8 pour les tests statistiques).**

#### 4.4.2.3. Voie Toll : défense

La défensine est une protéine effectrice libérée après activation de la voie Toll. Comme les autres AMP, elle est fortement surexprimée lors de la reconnaissance des pathogènes. Après 18 heures d'exposition à l'IMI, nous n'avons observé aucun changement pertinent dans son expression avec ou sans activation immunitaire. Après exposition au Confidor vert, nous avons constaté une forte augmentation de la régulation de la défensine à 10  $\mu\text{g/mL}$  de Confidor vert (200 fois plus que le témoin), qui augmente encore plus avec des concentrations plus élevées

de Confidor vert. Sans LPS, le Confidor vert ne modifie pas l'expression de la défensine chez les larves de bourdons (Figure 38). Les LPS seuls sans pesticides n'ont pas modifié de façon significative l'expression de la défensine par rapport au témoin sans LPS (ANNEXE 8). Cependant, d'autres études ont montré une régulation à la hausse de la défensine chez les bourdons lors d'une infection bactérienne (Barribeau and Schmid-Hempel, 2013; Erler et al., 2011). Erler et al. (2011) affirment que l'expression de la défensine était plus élevée 8 heures après l'infection et était significativement plus faible 12 et 24 heures après l'infection. Nos résultats ont été obtenus 18 heures après l'activation immunitaire, de sorte que l'expression de la défensine pourrait déjà avoir diminué à des niveaux d'expression du contrôle sans LPS.



**Figure 38 : L'expression relative de gène défensine dans le bourdon après 18 heures d'exposition à l'IMI (a) et au Confidor vert (b). L'absence de lettres indique l'absence de différence statistique (ANNEXE 8).**



### 4.4.3. Cytokines humaines

Lors de l'activation immunitaire, les cellules immunitaires sécrètent des protéines qui peuvent activer d'autres cellules de l'organisme. Ces molécules de signalisation sont capables de différencier ou d'appeler d'autres cellules au site d'activation. Nous avons étudié l'impact de l'IMI et du Confidor vert sur la production de trois cytokines différentes : GM-CSF, TNF-alpha et IL-6. L'expression des cytokines a été mesurée après 5 et 24 heures d'exposition aux pesticides.

#### 4.4.3.1. *GM-CSF*

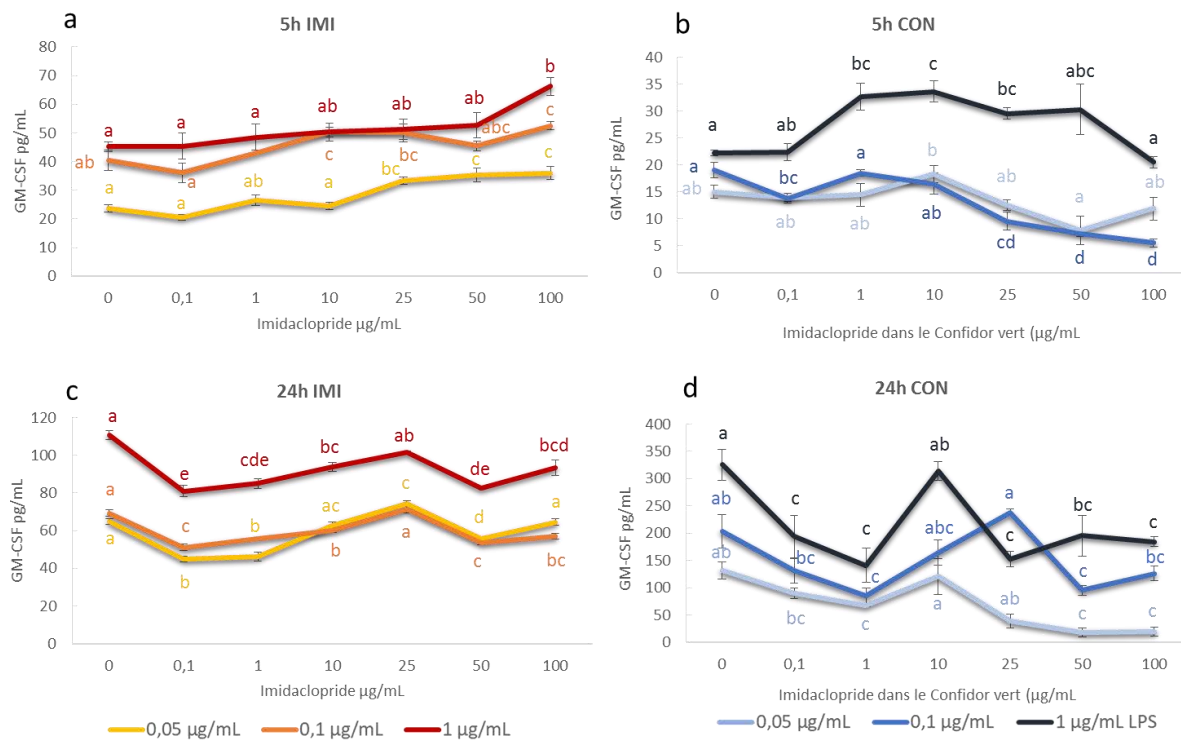
GM-CSF est une cytokine pro-inflammatoire excrétée par les cellules pour stimuler et activer les granulocytes et les macrophages lors de la reconnaissance de pathogènes. Elle est capable de stimuler la différenciation des cellules immunitaires pour devenir des cellules plus spécialisées et adaptées (Li et al., 2010). Excrétée comme l'une des premières cytokines dans la réponse immunitaire, elle est d'une grande importance pour potentialiser la fonction de présentation de l'antigène (Chantry et al., 1990).

Comme les THP-1 différenciées en macrophages produisent plus de GM-CSF que leur phénotype monocyttaire, nous avons différencié les cellules pendant 48 heures avec 5 µg/mL de PMA avant l'exposition au pesticide. L'excrétion de GM-CSF mesurée après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI sans activation par LPS est très faible ou non détectable. Aucune différence entre les concentrations de pesticides et le groupe témoin n'est détectée, de sorte que ces concentrations d'IMI n'entraînent pas de réponse immunitaire au contact des cellules seules. Les cellules ont été exposées à 0,05 ; 0,1 et 1 µg/mL de LPS. Après l'activation immunitaire avec les LPS, la production de cytokines augmente de façon significative dans les expériences de 5 et de 24 heures. Les concentrations de GM-CSF après 24 heures d'exposition sont nettement supérieures aux concentrations mesurées après 5 heures d'exposition. Comme le montre la figure 39a, l'IMI après 5 heures augmente les quantités de GM-CSF avec des

concentrations d'IMI plus élevées. Nous avons observé une augmentation significative de GM-CSF à 25 µg/mL d'IMI et 0,05 µg/mL LPS, à 10 et 100 µg/mL d'IMI et 0,1 µg/mL LPS, et à 100 µg/mL d'IMI et 1 µg/mL LPS. Alors que nous avons mesuré environ 45 pg/mL de GM-CSF dans le groupe témoin avec 1 µg/mL de LPS après 5 heures, nous avons mesuré 110 pg/mL de GM-CSF dans le même groupe témoin après 24 heures. A une durée d'incubation plus longue (24 heures), nous observons une diminution significative du GM-CSF à 0,1 µg/mL d'IMI dans les trois groupes de traitement LPS. Dans les trois groupes LPS, l'IMI entraîne une légère augmentation du GM-CSF jusqu'à 25 µg/mL lorsque les quantités atteignent les valeurs du groupe témoin sans IMI. Les concentrations diminuent de nouveau à 50 µg/mL d'IMI et augmentent légèrement à 100 µg/mL IMI.

Contrairement à l'augmentation constante de GM-CSF après 5 heures d'exposition à l'IMI, nous avons observé une diminution significative de GM-CSF lors de l'exposition au Confidor vert et 0,05 µg/mL et 0,1 µg/mL de LPS (Figure 39). À une activation immunitaire plus élevée avec 1 µg/mL de LPS, le Confidor vert provoque une augmentation de la GM-CSF à des concentrations de 1 et 10 µg/mL (calculé en équivalent IMI), ce qu'on peut reconnaître comme un facteur perturbateur pour les cellules (Baulig et al., 2003). Cette réponse pro-inflammatoire diminue avec les concentrations plus élevées de pesticides ( $\geq 25$  µg/mL) ne présentant alors aucune différence par rapport au groupe témoin, confirmant la suggestion de Qin (2012) que l'effet du pesticide a une rétroaction négative sur les cellules après action des concentrations plus élevées diminuant ainsi l'impact initiateur. Encore une fois, nous observons un schéma différent après un temps d'exposition plus long. Après 24 heures d'exposition au Confidor vert, les concentrations de GM-CSF diminuent significativement par rapport à la plus petite concentration testée (0,1 µg/mL d'IMI dans le Confidor vert) dans les trois groupes de traitement LPS différents (0,05 ; 0,1 ; et 1 µg/mL de LPS). Il est intéressant de noter une forte augmentation de GM-CSF à 10 µg/mL de LPS, qui a immédiatement diminué de nouveau à 25 µg/mL. Cela pourrait s'expliquer par les différents récepteurs d'affinité (voir également le paragraphe 4.3.3.1) entre l'IMI et sa formulation commerciale. Selon Suchail et al. (2001) à faible dose l'IMI active un récepteur à haut affinité et à forte dose des récepteurs à haute mais aussi à basse affinité. Cet effet des récepteurs à haute et faible affinité est plus prononcé après une plus longue exposition aux pesticides. Ce qui confirme l'hypothèse de Lind et al. (1998)

qui a supposé que l'IMI agit sur l'organisme des vertébrés encore longtemps après l'intoxication.



**Figure 39 : Production de GM-CSF dans les macrophages (THP-1 différenciées) après 5 ou 24 heures d'exposition à l'IMI (a,c) et au Confidor vert (b,d) et activation immunitaire avec des LPS. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques.**

#### 4.4.3.2. IL-6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée dans la phase aiguë de l'inflammation, où elle sert de messenger entre les cellules. Elle stimule la sécrétion d'autres cytokines et peut induire la différenciation d'autres cellules en cellules plus spécialisées. Nous avons quantifié la concentration d'IL-6 dans les THP-1 après 5 et 24 heures d'exposition aux pesticides. Les concentrations d'IL-6 étaient environ 10 fois plus élevées après 24 heures qu'après 5 heures. Comme indiqué au paragraphe 4.4.3.1, les concentrations de cytokines détectées sans activation immunitaire par LPS étaient très faibles ou non détectables. Les concentrations les

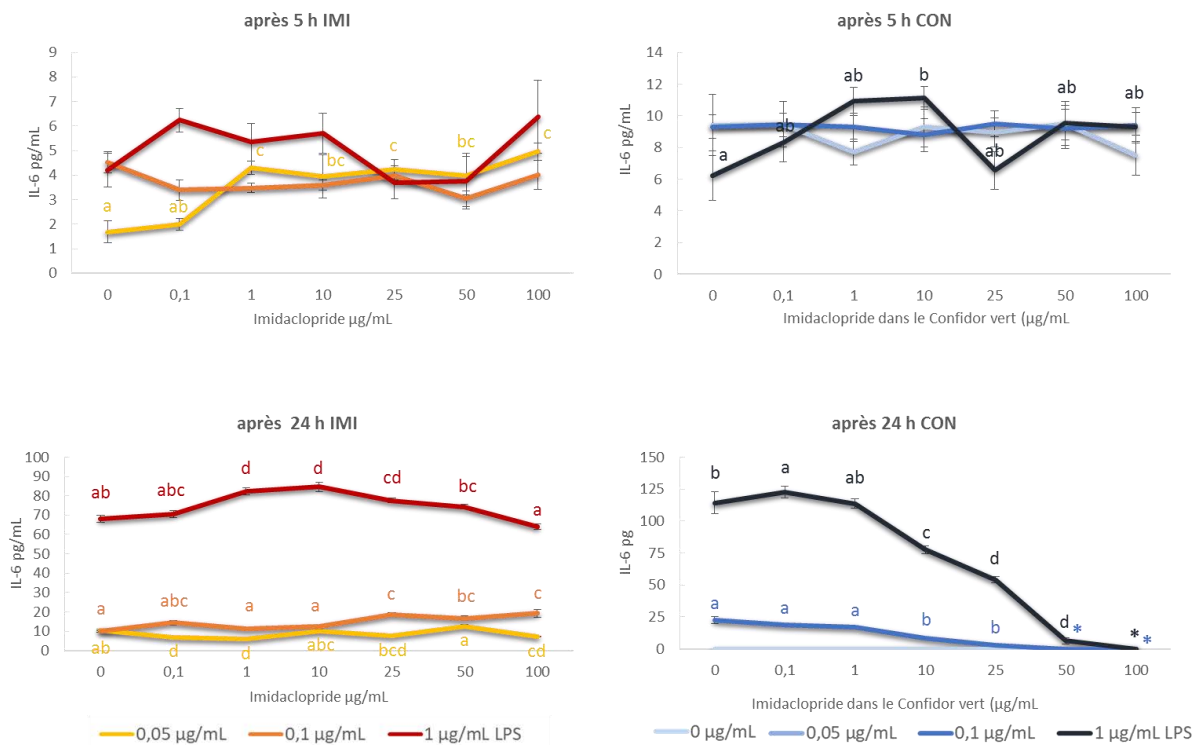
plus élevées observées après 5 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert ont été mesurées à une forte activation immunitaire (1 µg/mL LPS) et étaient d'environ de 7 pg/mL et 12 pg/mL respectivement. Après 24 heures d'exposition et une forte activation immunitaire (1 µg/mL de LPS), nous avons trouvé environ 70 pg/mL et 120 pg/mL d'IL-6 dans les groupes témoins négatifs d'IMI et de Confidor vert respectivement (Figure 40).

Après une exposition de courte durée (5 heures) et une activation par LPS de 0,05 µg/mL, nous avons observé une augmentation significative de l'IL-6 de  $1,7 \pm 0,4$  pg/mL dans le témoin à  $4,3 \pm 0,3$  pg/mL avec 1 µg/mL IMI. Cette augmentation est plus évidente avec des concentrations d'IMI jusqu'à  $4,9 \pm 0,4$  pg/mL à 100 µg/mL IMI. Lors d'une activation LPS plus forte (0,1 et 1 µg/mL LPS), nous avons observé des concentrations d'IL-6 plus élevées qu'avec 0,05 µg/mL LPS, mais nous n'avons trouvé aucune différence significative entre les différentes concentrations d'IMI et le même traitement par LPS. Après 5 heures d'exposition au Confidor vert, nous avons observé une augmentation significative de l'IL-6 à 10 µg/mL suivie d'une diminution des valeurs du groupe témoin aux concentrations plus élevées de Confidor vert.

Comme les concentrations d'IL-6 étaient dix fois plus élevées après 24 heures d'exposition aux pesticides, nous avons observé une image plus claire de l'impact de ces molécules. A 0,05 µg/mL, les concentrations d'IL-6 lors de l'activation du LPS oscillent entre  $5,9 \pm 0,5$  pg/mL et  $12,4 \pm 0,9$  pg/mL (avec un contrôle de  $10,3 \pm 0,8$  pg/mL) et aucune tendance exacte n'est visible. A 0,1 µg/mL d'activation par LPS, nous avons observé une légère augmentation de l'IL-6 avec l'augmentation des concentrations d'IMI et avons constaté une différence significative à 25 µg/mL d'IMI. Lors d'une activation par LPS plus élevée (1 µg/mL LPS), nous avons observé une augmentation significative à des concentrations d'IMI plus faibles (1 et 10 µg/mL IMI) tandis que l'IL-6 diminue avec des concentrations d'IMI plus élevées jusqu'à revenir aux valeurs du groupe témoin négatif. Comme nous l'avons observé pour la quantification du GM-CSF, nous voyons un effet pro-inflammatoire à de faibles concentrations, montrant une rétroaction négative lorsque les concentrations d'IMI deviennent trop élevées. Cet effet de rétroaction négatif était encore plus visible après l'exposition au Confidor vert. Ainsi à 0,1 µg/mL LPS, nous avons observé une diminution régulière de l'IL-6 à 10 µg/mL de Confidor vert jusqu'à ce que les concentrations de l'IL-6 tombent sous la limite de détection aux concentrations les plus élevées (50 et 100 µg/mL IMI de Confidor vert). Lors d'une activation

## RESULTATS ET DISCUSSION

LPS plus élevée (1 µg/mL LPS), nous avons observé une augmentation de l'IL-6 à la plus faible concentration testée de Confidor (0,1 µg/mL IMI) qui a ensuite commencé à diminuer après 1 µg/mL de Confidor vert jusqu'à ce qu'à 100 µg/mL de Confidor vert IL-6 ne soit plus détectable. L'IMI dans sa formulation commerciale, le Confidor vert, s'est donc révélé avoir un impact plus puissant sur la sécrétion d'IL-6 dans les THP-1 que dans sa molécule mère.



**Figure 40 : Production d'IL-6 après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques. Les étoiles montrent des concentrations non détectables.**

#### 4.4.3.3. *TNF-alpha*

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) joue un rôle important dans l'inflammation et provoque de la fièvre pendant la phase aiguë de la réaction. Elle est importante pendant l'inflammation systémique et conduit à la prolifération et à la différenciation des cellules ainsi qu'à l'apoptose des cellules qui y répondent (Hehlgans and Pfeffer, 2005).

Comme pour l'IL-6 (voir point 4.4.3.2), nous avons mesuré la production de TNF- alpha dans les THP-1 après 5 et 24 heures d'exposition aux pesticides. Contrairement à l'IL- 6, nous avons trouvé des concentrations plus élevées de TNF-alpha dans les groupes témoins négatifs après 5 heures qu'après 24 heures. Alors qu'après 24 heures nous avons trouvé  $740,1 \pm 9,4$  pg/mL de TNF- $\alpha$  dans le groupe témoin avec  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS nous avons détecté  $2503,4 \pm 43,7$  pg/mL du même groupe après seulement 5 heures d'exposition.

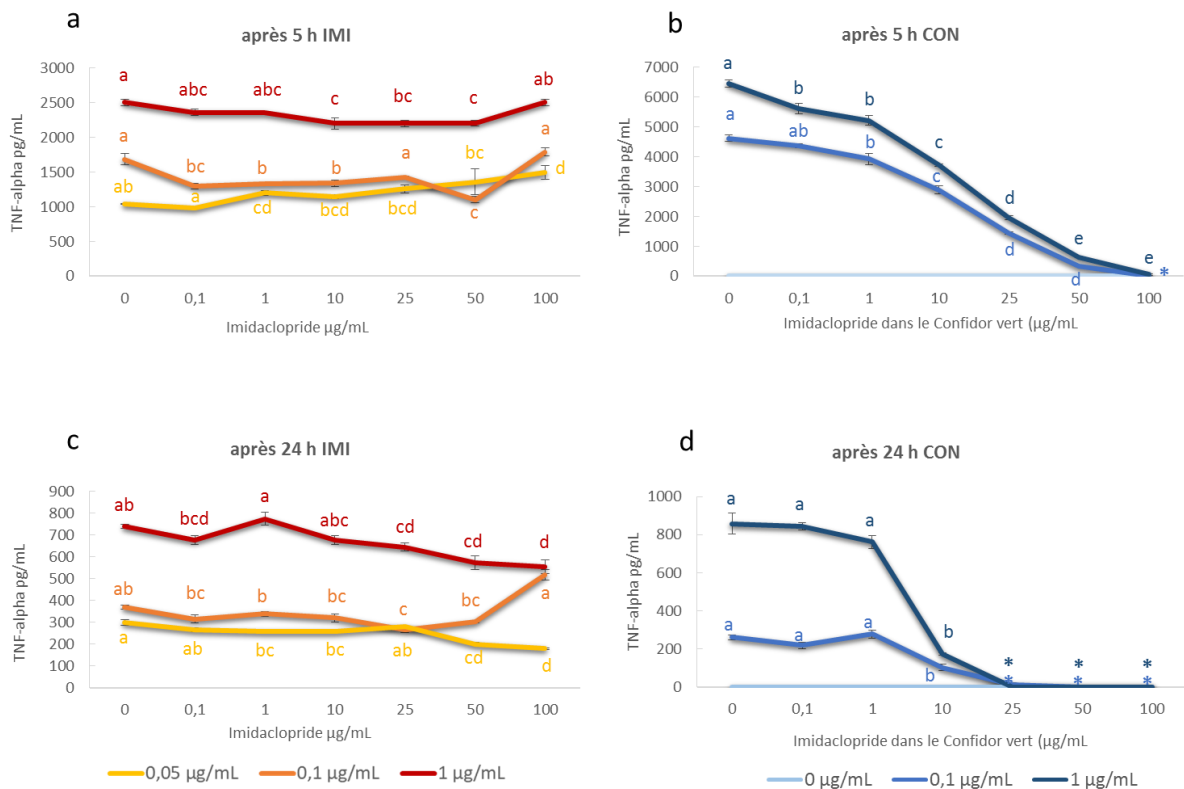
Des résultats similaires ont été obtenus après exposition au Confidor vert. Dans le groupe témoin sans pesticide et  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS, nous avons observé  $6456,1 \pm 128,9$  pg/mL après 5 heures, alors que nous n'avons trouvé que  $857,9 \pm 54,4$  pg/mL après 24 heures. L'IMI diminue significativement la sécrétion de TNF-alpha après 5 heures à la plus faible concentration de  $0,1 \mu\text{g/mL}$  lorsqu'il est activé avec  $0,1 \mu\text{g/mL}$  de LPS. A une concentration de LPS inférieure à  $0,05 \mu\text{g/mL}$ , l'IMI semble plutôt induire la production de TNF-alpha avec des concentrations d'IMI croissantes.

À des niveaux élevés de LPS ( $1 \mu\text{g/mL}$ ), l'IMI a réduit le TNF-alpha à  $10 \mu\text{g/mL}$  d'IMI, à la seule exception de  $100 \mu\text{g/mL}$ , lorsque les concentrations ont augmenté et atteint les valeurs du groupe témoin. Après 24 heures et à  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS, l'IMI a diminué significativement le TNF-alpha à partir de  $25 \mu\text{g/mL}$ , atteignant un minimum de  $555,4 \pm 32,6$  pg/mL à la concentration IMI maximale ( $100 \mu\text{g/mL}$ , Figure 41).

Comme on l'a déjà vu pour la production d'IL-6 (voir point 4.4.3.2), le Confidor vert a eu un impact beaucoup plus important sur la production de TNF-alpha dans les THP-1 que sa molécule pure IMI. Déjà après une courte exposition (5 heures), le Confidor vert réduit significativement le TNF-alpha de  $1 \mu\text{g/mL}$  de LPS à la concentration la plus faible testée ( $0,1 \mu\text{g/mL}$  d'IMI dans le Confidor vert). Le TNF-alpha diminue drastiquement avec l'augmentation

## RESULTATS ET DISCUSSION

des doses jusqu'à ce que les cellules ne produisent plus que  $48,5 \pm 20$  pg/mL à 100  $\mu\text{g/mL}$  de Confidor vert, contre presque 6500 pg/mL dans le groupe témoin. Lorsque les cellules sont activées avec moins de LPS (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ), cette diminution était si forte que nous ne pouvions détecter aucun TNF-alpha à 100  $\mu\text{g/mL}$  de Confidor vert. La quantité était si faible qu'elle n'était pas détectable avec notre kit de test ELISA. La limite de détection était de 4,5 pg/mL. Cet effet négatif important était encore plus fort après 24 heures d'exposition où nous n'avons trouvé aucune production détectable de TNF-alpha pour les deux traitements par LPS (0,1 et 1  $\mu\text{g/mL}$ ) à partir de 25  $\mu\text{g/mL}$  de Confidor vert.



**Figure 41 : Production de TNF-alpha dans les THP-1 après 5 et 24 heures d'exposition à l'IMI et au Confidor vert. Les lettres de mêmes couleurs montrent des différences statistiquement significatives entre les différentes concentrations d'IMI ou de Confidor pour un même traitement par LPS. Voir ANNEXE 9 pour les p-values et les modèles statistiques. Les étoiles montrent des concentrations non détectables.**

#### 4.4.4. Comparaison de l'impact de l'IMI sur les différentes voies de signalisation chez trois espèces différentes

La réponse immunitaire à une infection ou à une blessure est un processus très complexe, impliquant plusieurs voies différentes de signalisation immunitaire. Chaque voie de signalisation possède des molécules de signalisation spécifiques et conduit à la transcription d'autres protéines effectrices. Les bactéries Gram-positives ou Gram-négatives ainsi que les champignons peuvent déclencher différentes voies de signalisation et induire différentes réponses immunitaires. L'intoxication par l'IMI peut donc affecter l'immunocompétence à de nombreux niveaux différents. Nous avons étudié l'expression de différentes protéines impliquées dans différentes voies de signalisation immunitaire des abeilles et des bourdons après exposition à l'IMI et au Confidor vert. Nous avons également analysé la production de trois cytokines différentes dans la lignée cellulaire humaine THP-1.

En effet, nous avons constaté que l'IMI en combinaison avec une activation immunitaire avec de LPS d'*E. coli* a montré des effets différents non seulement sur les trois espèces différentes mais aussi en fonction du paramètre immunitaire testé. Chez les abeilles, l'IMI ou le Confidor vert exercent une forte influence sur l'expression des protéines lorsque les cellules ne sont pas activées par les LPS. Basket, TEP-A et relish sont fortement régulés à la hausse lorsque les cellules sont exposées à l'IMI ou au Confidor vert sans activation LPS. L'IMI modifie donc la voie JNK, JAK/STAT et Imd chez les abeilles, même sans activation immunitaire. Chez les bourdons, nous avons trouvé une altération de l'expression du TEP-A et de relish après exposition à l'IMI et au Confidor vert sans LPS, mais les différences ne sont pas statistiquement significatives entre elles. Néanmoins, nous avons observé une régulation à la hausse après l'exposition à l'IMI alors que nous avons observé une régulation à la baisse après l'exposition au Confidor vert. Contrairement aux deux pollinisateurs, l'IMI et le Confidor vert n'entraînent pas de réponse pro-inflammatoire chez les THP-1. Les effets des pesticides sur la production de cytokines par les THP-1 ne sont observés que lorsque les cellules immunitaires sont également activées. Ainsi, nous pouvons montrer que l'IMI n'a un effet toxique sur les THP-1 que lorsque les cellules sont confrontées à des agents pathogènes.



Des expériences sur la perte de mutants fonctionnels de *D. melanogaster* ont montré que la voie Imd est nécessaire à la survie des drosophiles en réponse à la toxicité d'IMI (Daisley et al., 2017). Les mutants qui n'avaient pas le gène « relish » ont montré une survie globale réduite après exposition à l'IMI par rapport aux mouches normales. La voie Imd est essentielle pour la réponse immunitaire aux bactéries Gram-négatives. Son facteur transcriptionnel a des effets pléiotropes en dehors de la régulation immunitaire, y compris la promotion de la survie en réponse au stress thermique environnemental. Les mouches exposées à l'IMI ont réagi à la chaleur comme des mutants qui manquaient le facteur transcriptionnel. L'homologue de la voie Imd chez les vertébrés est la voie TNFR avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Di Prisco et al. (2013) ont montré que la clothianidine, un autre néonicotinoïde, a entraîné une forte régulation à la hausse d'un gène régulateur négatif de l'activation du NF- $\kappa$ B chez les abeilles et la drosophile. L'augmentation de ces gènes a entraîné une altération de l'activation du NF- $\kappa$ B par le pesticide. Ces deux gènes étaient aussi fortement régulés à la hausse lorsque les abeilles et les mouches n'étaient pas immunisées. Il a également obtenu des résultats similaires après une exposition à la clothianidine dans des THP-1 (Di Prisco et al., 2017). Le néonicotinoïde a réduit le TNF- $\alpha$  dans les surnageants cellulaires et son expression génétique. De plus, elle a conduit à une régulation à la baisse d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de la NF- $\kappa$ B.

Contre notre hypothèse, le Confidor vert n'a pas nécessairement eu un impact plus fort sur l'expression génique que la molécule pure l'IMI. Il a montré des effets similaires ou des effets moins graves sur les deux pollinisateurs. Cependant, il a eu un effet important sur la production de cytokines chez les THP-1. L'IMI sous sa forme « molécule active », a montré une réponse pro-inflammatoire à de faibles concentrations, ce qui a conduit à une rétroaction négative à des concentrations plus élevées réduisant les concentrations de cytokines aux niveaux du contrôle. Le Confidor vert, au contraire, a considérablement réduit la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, à partir de 25 et 50  $\mu$ g/mL respectivement, les concentrations se situant sous la limite de détection. C'est assez surprenant, car on peut supposer qu'un insecticide devrait avoir un impact plus important sur les cellules d'insectes que sur les cellules humaines. Dans d'autres études, les insecticides organophosphorés ont montré un effet inflammatoire sur les THP-1 façon temps-dépendante avec activation du TNF- $\alpha$  et d'autres cytokines pro-

inflammatoires (Proskocil et al., 2014; Singh and Jiang, 2003). Cependant Salazar et al. (2008) ont constaté que d'autres pesticides inhibaient les cytokines pro-inflammatoires. C'était également le cas des cellules sanguines périphériques humaines exposées au glyphosate, qui a inhibé l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2, mais n'a pas montré d'effet sur la libération du TNF- $\alpha$  (Nakashima et al., 2002). Chez le rat, l'IMI a augmenté l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et d'autres cytokines pro-inflammatoires après une exposition chronique sur 30 jours (Duzguner and Erdogan, 2012). Özdemir et al. (2018) ont également découvert que l'IMI a activé le TNF- $\alpha$  dans les branchies, le foie et le cerveau des carpes exposées à 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'IMI.

En outre, nos résultats montrent que l'IMI a eu un impact plus important sur les voies Imd, JAK/STAT et JNK que sur la voie de Toll des abeilles. Il faut cependant à mentionner que l'expression des gènes après l'immunodéficiência et/ou l'intoxication varie aussi beaucoup dans la littérature. Non seulement leurs différences dans l'expression génétique entre différentes colonies de bourdons ou même entre les ouvrières d'une même colonie (Schlüns et al., 2010), mais aussi dans l'expression génétique des abeilles peuvent varier. Alors que certaines références mentionnent par exemple que la défensine est régulée à la hausse par l'IMI (Christen et al., 2016), d'autres ont observé une régulation à la baisse (Shi et al., 2017). Certaines différences dans l'expression des gènes peuvent s'expliquer par l'âge (abeilles hivernales jeunes et âgées, Ratiu et al., 2016), ainsi que par les différents stades de développement (nymphe aux yeux blancs et aux yeux bruns ; Tesovnik et al. 2017). Cependant, comme chez les bourdons et chez les abeilles, des controverses ont été trouvées lors de l'analyse de l'expression génétique des abeilles du même âge et de la même ruche. Collison et al. (2018), par exemple, ont constaté que l'IMI avait effectivement affecté la transcription des AMP, mais en retour, ils n'ont trouvé aucune différence dans l'analyse des concentrations de ces peptides dans l'hémolymphe. Ils appellent donc à la prudence dans l'utilisation de l'expression des gènes comme biomarqueurs dans l'évaluation des risques liés aux pesticides, car les réponses transcriptionnelles dans les gènes liés au système immunitaire ne sont pas encore des indicateurs fiables des effets des pesticides sur la santé des abeilles.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le groupe d'insecticides le plus couramment utilisé sont les néonicotinoïdes et leurs résidus ont été trouvés dans les fruits et légumes traités, ainsi que dans les abeilles, leur pollen et le miel. Au cours de la dernière décennie, les néonicotinoïdes ont fait l'objet de controverses dans la littérature, car ils ont été associés à un déclin mondial des pollinisateurs. Bien que la toxicité aiguë soit plutôt rare, la cause de ce déclin était plutôt associée à l'exposition chronique aux pesticides. De plus l'effet additif des néonicotinoïdes et des pathogènes a été démontré dans de nombreuses études (Abbo et al., 2017; Collison et al., 2016; Czerwinski and Sadd, 2017; López et al., 2017). Bien que la plupart d'entre elles aient porté sur les néonicotinoïdes et les effets des agents pathogènes sur l'aptitude et la santé des abeilles ou sur les réponses cellulaires aux pesticides seuls, seules quelques-unes concernaient la réactivité cellulaire à côté des pesticides et des agents pathogènes.

Nous avons donc étudié l'effet de l'IMI en tant que molécule active et dans sa formulation commerciale, le Confidor vert, sur la réactivité des cellules immunitaires de deux pollinisateurs (abeille et bourdon) et de deux lignées cellulaires continues (cellules humaines THP-1 et *Drosophila Schneider 2*) lorsque les cellules sont simultanément confrontées à un pathogène (LPS de *Escherichia coli*). Nous avons testé la viabilité cellulaire, l'activité phagocytaire, la production de ROS et de NOS ainsi que la production de cytokines et l'expression de protéines immunologiques pertinentes. Les cellules de la drosophile Schneider 2 ont servi à mettre en œuvre des conditions expérimentales pour des expériences sur les hémocytes des deux pollinisateurs. Des hémocytes ont été extraits de larves d'abeilles ou de bourdons, juste avant les expériences pour assurer la qualité des cellules.

Nous avons constaté que le stress par activation immunitaire avec le LPS intensifiait l'impact de l'IMI et du Confidor vert sur les paramètres spécifiques des quatre différentes cellules testées. Nous avons donc montré que l'IMI et les agents pathogènes agissent de façon cumulative au niveau cellulaire. Bien que l'IMI ou le Confidor vert seul, sans LPS, aient déjà provoqué une réaction dans les cellules d'insectes, nous n'avons observé une action suppressive des pesticides sur les cellules humaines THP-1 que lorsqu'elles étaient également

exposées au LPS. La seule exception a été trouvée pour la production de NO où les cellules THP-1 ont montré une plus grande modification sans activation LPS. Il convient également de mentionner qu'en ce qui concerne la production de NO, les THP-1 ont été plus fortement touchées par les pesticides que les hémocytes d'insectes. Bien que les concentrations globales de NO dans les cellules d'insectes aient augmenté, les concentrations ont varié augmentant dans un premier temps puis diminuant à mesure que les concentrations de pesticides augmentaient au contact des THP-1. Les différences d'activité ROS et NOS entre les différentes espèces peuvent s'expliquer par des différences inter espèce qui ont conduit au développement de système enzymatique très spécifique pour réduire les ROS et NOS chez les pollinisateurs, qui n'existe pas chez l'Homme. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi nous constatons un effet inhibiteur sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez les abeilles et les bourdons après une exposition à l'IMI ou au Confidor vert, bien que les polluants induisent plutôt des ROS en général.

Dans les trois cellules d'insectes, l'IMI a eu un impact plus important sur la phagocytose lorsque l'exposition a eu lieu en combinaison avec les LPS. Bien que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de NO ait varié entre une activation immunitaire élevée ou faible, la phagocytose d'hémocytes n'a pas varié entre les deux concentrations de LPS différentes. Comme Moret & Schmid-Hempel (2000) l'ont affirmé dans leur étude sur la phagocytose chez les bourdons, les LPS et les billes de latex peuvent induire différentes voies du système immunitaire. Cela pourrait expliquer l'augmentation puis la diminution du NO et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la dose de LPS en présence d'IMI, bien qu'aucune différence entre la concentration faible et élevée de LPS pendant l'activité phagocytaire n'ait été relevée. L'IMI a toutefois induit une réduction plus forte de la phagocytose lorsque les hémocytes étaient simultanément exposés aux LPS. Les cellules doivent réagir à de multiples stress et activer plusieurs voies immunitaires en même temps. Cependant, les billes et les LPS ne déclenchent pas la même voie de signalisation, de sorte que l'effet de doses plus élevées de LPS peut être négligeable pour la phagocytose des billes de latex. En analysant l'expression de plusieurs protéines impliquées dans différentes voies immunitaires, il devient plus clair que l'IMI affecte différentes voies de signalisation à des degrés différents. Di Prisco et ses collaborateurs (2013, 2017) ont découvert que la clothianidine, un autre insecticide néonicotinoïde, affecte négativement l'expression du

facteur de transcription NF- $\kappa$ B, car elle régule à la hausse un gène qui sert de modulateur négatif de son activation. C'était le cas des abeilles, de la drosophile et des THP-1. Il est donc possible que l'IMI ait une action similaire sur les cellules de ces trois espèces. Nous avons aussi constaté que l'IMI sans LPS a entraîné une augmentation de la régulation du facteur de transcription relish (homologue de NF- $\kappa$ B) chez l'abeille et le bourdon. Ce n'est qu'après une forte activation immunitaire (10  $\mu$ g/mL de LPS) que nous avons observé une légère baisse de la régulation de relish. Mais ce n'était pas seulement la voie d'I $\kappa$ B qui était affectée dans les deux espèces de pollinisateur, nous avons également observé une forte régulation à la hausse des protéines des voies de signalisation JNK et JAK/STAT. Là encore, les deux protéines (basket et TEP-A) étaient particulièrement régulées à la hausse lorsque les cellules n'étaient pas immunisées. L'IMI doit donc activer d'une manière ou d'une autre ces voies de signalisation. D'autre part, la voie Toll s'est révélée moins fortement affectée chez les deux pollinisateurs. Le Confidor vert semble être moins efficace sur toutes les voies immunitaires des deux pollinisateurs que son ingrédient actif l'IMI bien que d'autres études aient constaté que les effets du produit commercial étaient plus importants que ceux de la molécule active (Beggel et al., 2010; Mann and Bidwell, 1999; Richard et al., 2005). Beggel et al. (2010) ont même constaté que plus de 90 % des produits commerciaux présentaient une toxicité croissante par rapport à la molécule active.

Cependant, nous avons observé cet effet, lorsque nous avons examiné les résultats sur la lignée cellulaire humaine THP-1. Bien que l'IMI n'ait pas eu un impact très important sur la production de cytokines, le Confidor vert a eu une action inhibitrice très forte sur la production de cytokines. Avec les résultats obtenus pour le NO, nous avons donc observé une toxicité plus élevée du produit commercial sur les cellules immunitaires humaines. Il semble que les additifs, comme le PC, rendent l'impact de la molécule active plus important sur les cellules humaines que sur les cellules d'insectes. Cela pourrait être dû à des processus de détoxification différents chez les vertébrés et les invertébrés. La détoxification est un processus très énergivore qui peut donc entraîner un affaiblissement du métabolisme de l'organisme. En effet, Abbo et ses collaborateurs (2017) ont démontré dans une étude récente que l'IMI dans les concentrations environnementales réduisait le titre de vitellogénine, un précurseur du jaune d'œuf qui est souvent lié à l'homéostasie énergétique chez les ovipares et lié à leur

reproduction. Des nombreuses études se sont attardé les actions immunosuppressives potentielles des néonicotinoïdes et des perturbateurs endocriniens sur des vertébrés comme les oiseaux, les amphibiens et les mammifères (Gibbons et al., 2015; Goulson, 2013). Nos études confirment que l'IMI affecte également la compétence immunitaire des vertébrés comme celles des insectes. Ceci est préoccupant, sachant que les Hommes sont également exposés aux néonicotinoïdes car leurs résidus se trouvent sur les fruits et légumes que nous consommons. Les effets étaient présents à des concentrations aussi faibles que 0,1 µg/mL d'IMI et à 25 µg/mL nous avons observé une inhibition totale de la production de cytokines dans les cellules humaines. Dans le mode d'emploi du Confidor vert, il est conseillé de pulvériser jusqu'à 166 µg/mL d'IMI sur les plantes. Des précautions particulières doivent être prises lors de l'application du produit ainsi que lors de la consommation des fruits et légumes traités. Comme les études *in vivo* sont extrêmement rares chez l'Homme, les expériences *in vitro* devraient faire l'objet d'une plus grande attention, d'autant plus que l'action immunosuppressive des néonicotinoïdes chez l'Homme est peu connue. Il serait très intéressant de compléter cette étude par d'autres analyses sur l'expression génique des protéines impliquées dans différentes voies immunitaires chez l'Homme. Ainsi ça serait intéressant de compléter les résultats pour les pollinisateurs avec les protéines homologues manquantes des abeilles et des bourdons. Il serait aussi judicieux de compléter cette étude avec les pollinisateurs par la mesure des protéines homologues manquantes, afin de mieux comprendre le processus complet de signalisation et défense des insectes et en générale l'implication des pesticides dans les phénomènes d'immunosuppression et/ou d'une stimulation immunitaire, des processus pro-inflammatoires et de transformations cellulaires chez les invertébrés et vertébrés



# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbo, P.M., Kawasaki, J.K., Hamilton, M., Cook, S.C., DeGrandi-Hoffman, G., Li, W.F., Liu, J., Chen, Y.P., 2017. Effects of Imidacloprid and Varroa destructor on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Sci.* 24, 467–477.
- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787. <https://doi.org/10.1038/35021228>
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782.
- Allsopp, M.H., De Lange, W.J., Veldtman, R., 2008. Valuing insect pollination services with cost of replacement. *PLoS One* 3, e3128.
- Anderson, J.C., Dubetz, C., Palace, V.P., 2015. Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Sci. Total Environ.* 505, 409–422. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.090>
- Arain, M., Hu, X.-X., Li, G.-Q., 2014. Assessment of Toxicity and Potential Risk of Butene-fipronil Using *Drosophila melanogaster*, in Comparison to Nine Conventional Insecticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 92, 190–195. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1155-8>
- Bal, R., Erdogan, S., Theophilidis, G., Baydas, G., Naziroglu, M., 2010. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patch-clamp recording. *NeuroToxicology* 31, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.10.004>
- Barribeau, S.M., Schmid-Hempel, P., 2013. Qualitatively different immune response of the bumblebee host, *Bombus terrestris*, to infection by different genotypes of the trypanosome gut parasite, *Crithidia bombi*. *Infect. Genet. Evol.* 20, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.09.014>
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M.S., Nauen, R., 2015. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 78–87.
- Baulig, A., Sourdeval, M., Meyer, M., Marano, F., Baeza-Squiban, A., 2003. Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. *Toxicol. In Vitro* 17, 567–573.
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Sci. Total Environ.* 408, 3169–3175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.004>
- Bennasroune, A., Rojas, L., Foucaud, L., Goulaouic, S., Laval-Gilly, P., Fickova, M., Couleau, N., Durandet, C., Henry, S., Falla, J., 2012. Effects of 4-nonylphenol and/or diisononylphthalate on THP-1 cells: impact of endocrine disruptors on human immune system parameters. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 25, 365–376.
- Benzidane, Y., Lapied, B., Thany, S.H., 2011. Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 101, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.09.005>

- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Innate Immun.* 40, 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25, 280–288.
- Bonmatin, J.-M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E.A.D., 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 35–67.
- Boucher, S., 2016. *Maladies des abeilles*. Editions France agricole.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R., 2016. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>
- Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Wick, C.H., Stanford, M.F., Zulich, A.W., Jabbour, R.E., Deshpande, S.V., McCubbin, P.E., Seccomb, R.A., Welch, P.M., 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. *PLoS One* 5, e13181.
- Browne, N., Heelan, M., Kavanagh, K., 2013. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence* 4, 597–603.
- Camp, A., Buchwalter, D., 2016. Can it take the heat: Temperature-enhanced toxicity in the mayfly *Isonychia bicolor* exposed to the neonicotinoid insecticide imidacloprid. *Aquat. Toxicol.* 178, 49–57.
- Casida, J.E., 2010. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2923–2931.
- Censoplano, N., Epting, C.L., Coates, B.M., 2014. The Role of the Innate Immune System in Sepsis. *Pediatr. Crit. Care--Sepsis* 15, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.cpem.2014.04.007>
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., Pettis, J.S., 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Physiol.* 89, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.004>
- Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J., 2014. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 23, 37–45.
- Chantry, D., Turner, M., Brennan, F., Kingsbury, A., Feldmann, M., 1990. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces both HLA-DR expression and cytokine production by human monocytes. *Cytokine* 2, 60–67. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(90\)90044-T](https://doi.org/10.1016/1043-4666(90)90044-T)
- Chatenoud, L., Bach, J.-F., 2012. *Immunologie*. Médecine sciences publications-Lavoisier, Paris.
- Chauzat, M.-P., Carpentier, P., Martel, A.-C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Madec, F., Aubert, M., Faucon, J.-P., 2009. Influence of pesticide residues on honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) colony health in France. *Environ. Entomol.* 38, 514–523.
- Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.-P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (*Hymenoptera: Apidae*) to monitor pesticide presence in continental France. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 103–111.

- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186–188.
- Christen, V., Mittner, F., Fent, K., 2016. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Technol.* 50, 4071–4081.
- Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A., Perry, M.J., 2016. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environ. Health Perspect.* 125, 155–162.
- Clos, J., 2012. L'immunité chez les animaux et les végétaux: aspects fondamentaux et physiopathologiques. Médecine sciences publications, Paris, Lavoisier 2012, pp. 31-36; 67-71.
- Codling, G., Al Naggar, Y., Giesy, J.P., Robertson, A.J., 2016. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera* L.) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere* 144, 2321–2328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.135>
- Collison, E., Hird, H., Cresswell, J., Tyler, C., 2016. Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health—a critical analysis. *Biol. Rev.* 91, 1006–1019.
- Collison, E.J., Hird, H., Tyler, C.R., Cresswell, J.E., 2018. Effects of neonicotinoid exposure on molecular and physiological indicators of honey bee immunocompetence. *Apidologie* 1–13.
- Corsini, E., Codecà, I., Mangiaratti, S., Birindelli, S., Minoia, C., Turci, R., Viviani, B., Facchi, A., Vitelli, N., Lucchi, L., 2007. Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222, 202–210.
- Corsini, E., Sokooti, M., Galli, C., Moretto, A., Colosio, C., 2013. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307, 123–135.
- Costa, C., Silvari, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J.J., Trovato, A., De Pasquale, R., 2009. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 672, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.018>
- Couleau, N., Techer, D., Pagnout, C., Jomini, S., Foucaud, L., Laval-Gilly, P., Falla, J., Bennisroune, A., 2012. Hemocyte responses of *Dreissena polymorpha* following a short-term in vivo exposure to titanium dioxide nanoparticles: Preliminary investigations. *Sci. Total Environ.* 438, 490–497.
- Cresswell, J.E., 2011. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149–157.
- Cresswell, J.E., Page, C.J., Uygun, M.B., Holmbergh, M., Li, Y., Wheeler, J.G., Laycock, I., Pook, C.J., de Ibarra, N.H., Smirnoff, N., Tyler, C.R., 2012. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology* 115, 365–371. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2012.05.003>
- Czerwinski, M.A., Sadd, B.M., 2017. Detrimental interactions of neonicotinoid pesticide exposure and bumblebee immunity. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* 327, 273–283.
- Daisley, B.A., Trinder, M., McDowell, T.W., Welle, H., Dube, J.S., Ali, S.N., Leong, H.S., Sumarah, M.W., Reid, G., 2017. Neonicotinoid-induced pathogen susceptibility is mitigated by

- Lactobacillus plantarum immune stimulation in a *Drosophila melanogaster* model. *Sci. Rep.* 7, 2703.
- David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Rotheray, E.L., Hill, E.M., Goulson, D., 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ. Int.* 88, 169–178.
- DeFilippo, J., Beck, G., 2018. Cytokines of Invertebrate Immunity, in: Reference Module in Life Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90751-9>
- Déglise, P., Grünewald, B., Gauthier, M., 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci. Lett.* 321, 13–16. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02400-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02400-4)
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.-M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52, 81–106.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F., 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18466–18471.
- Di Prisco, G., Iannaccone, M., Ianniello, F., Ferrara, R., Caprio, E., Pennacchio, F., Capparelli, R., 2017. The neonicotinoid insecticide Clothianidin adversely affects immune signaling in a human cell line. *Sci. Rep.* 7, 13446.
- Dively, G.P., Kamel, A., 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4449–4456.
- Dunier, M., Siwicki, A.K., Demaël, A., 1991. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*): III. In Vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in Vivo effects on humoral response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 79–87. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(91\)90049-U](https://doi.org/10.1016/0147-6513(91)90049-U)
- Duzguner, V., Erdogan, S., 2012. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104, 58–64.
- Erler, S., Popp, M., Lattorff, H.M.G., 2011. Dynamics of immune system gene expression upon bacterial challenge and wounding in a social insect (*Bombus terrestris*). *PLoS One* 6, e18126.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 645–656.
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S62–S72.
- Farmer, J.D., Packard, N.H., Perelson, A.S., 1986. The immune system, adaptation, and machine learning. *Phys. Nonlinear Phenom.* 22, 187–204.
- Fausser-Misslin, A., Sadd, B.M., Neumann, P., Sandrock, C., 2014. Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. *J. Appl. Ecol.* 51, 450–459.
- Feldhaar, H., Gross, R., 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes Infect.* 10, 1082–1088.

- Fernández-Alba, A.R., Tejedor, A., Agüera, A., Contreras, M., Garrido, J., 2000. Determination of imidacloprid and benzimidazole residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry after ethyl acetate multiresidue extraction. *J. AOAC Int.* 83, 748–755.
- Forister, M.L., Cousens, B., Harrison, J.G., Anderson, K., Thorne, J.H., Waetjen, D., Nice, C.C., De Parsia, M., Hladik, M.L., Meese, R., 2016. Increasing neonicotinoid use and the declining butterfly fauna of lowland California. *Biol. Lett.* 12, 20160475.
- Geijsen, N., Koenderman, L., Coffey, P.J., 2001. Specificity in cytokine signal transduction: lessons learned from the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12, 19–25. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(00\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00019-8)
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332–352.
- Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., 2010. Imidacloprid Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Service. <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.pdf>.
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., 2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118.
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.-C., Linde, A., Genersch, E., 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3032–3038.
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., 2011. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.* 13, 404–413.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., Kurtti, T.J., 2013. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PloS One* 8, e69831.
- Goldman, L.R., 2007. Managing Pesticide Chronic Health Risks. *J. Agromedicine* 12, 67–75. [https://doi.org/10.1300/J096v12n01\\_07](https://doi.org/10.1300/J096v12n01_07)
- Goulson, D., 2014. Ecology: Pesticides linked to bird declines. *Nature* 511, 295.
- Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987.
- 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, 1255957.
- Gross, E., 2009. Allelochemical reactions.
- Halliwell, B., 1991. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Oxid. Antioxid. Pathophysiol. Determinants Ther. Agents* 91, S14–S22. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90279-7)
- Hallmann, C.A., Foppen, R.P., van Turnhout, C.A., de Kroon, H., Jongejans, E., 2014. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature* 511, 341.
- Hehlgans, T., Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20.

- Hernandez, J., Volland, A., Leyshon, B., Juda, M., Ridlon, J.M., Johnson, R.W., Steelman, A.J., 2018. Effect of imidacloprid ingestion on immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Sci. Rep.* 8, 11615.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669.
- Hillyer, J.F., 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* 58, 102–118.
- Hladik, M.L., Corsi, S.R., Kolpin, D.W., Baldwin, A.K., Blackwell, B.R., Cavallin, J.E., 2018. Year-round presence of neonicotinoid insecticides in tributaries to the Great Lakes, USA. *Environ. Pollut.* 235, 1022–1029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.013>
- Hladik, M.L., Kolpin, D.W., Kuivila, K.M., 2014. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. *Environ. Pollut.* 193, 189–196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.033>
- Hladik, M.L., Vandever, M., Smalling, K.L., 2016. Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Sci. Total Environ.* 542, Part A, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.077>
- Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R., Andó, I., 2014. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev. Comp. Immunol.* 42, 47–56.
- Hörtig, W., 1993. Über das Vorkommen von Pestiziden im Trinkwasser und in der Nahrung Pesticides in Drinking Water and Food. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 21, 197–202.
- Hunter, W.B., 2010. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* 46, 83–86.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot.* 23, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2010. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1–6.
- Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., Silverman, N., 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20, 637–649.
- Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., Machera, K., 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486, 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042>
- Kaupilla, S., Maaty, W.S., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, M.T., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K., 2003. Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila*. *Oncogene* 22, 4860–4867.
- Kiesecker, J.M., 2002. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9900–9904.



- Klein, A.-M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274, 303–313.
- Klestadt, D., Laval-Gilly, P., Falla, J., 2002. Ozone-mediated cytotoxicity after short-term exposure and its relation to the production of cellular metabolites (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Cell Biol. Toxicol.* 18, 259–269.
- Ko, A.-Y., Rahman, M.M., Abd El-Aty, A.M., Jang, J., Park, J.-H., Cho, S.-K., Shim, J.-H., 2014. Development of a simple extraction and oxidation procedure for the residue analysis of imidacloprid and its metabolites in lettuce using gas chromatography. *Food Chem.* 148, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.055>
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., 2005. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335–346.
- Komiyama, K., Okaue, M., Miki, Y., Ohkubo, M., Moro, I., Cooper, E.L., 2003. Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons: The 7th international symposium on earthworm ecology. Cardiff. Wales. 2002. *Pedobiologia* 47, 717–723.
- Korayem, A.M., Khodairy, M.M., Abdel-Aal, A.-A.A., El-Sonbaty, A.A., 2012. The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *J. Biol. Earth Sci.* 2, 93–109.
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., Su, Z., 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* 37, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Lind, R.J., Clough, M.S., Reynolds, S.E., Earley, F.G., 1998. [3H] Imidacloprid Labels High- and Low-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptor-like Binding Sites in the Aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 62, 3–14.
- Linder, J.E., Owers, K.A., Promislow, D.E., 2008. The effects of temperature on host–pathogen interactions in *D. melanogaster*: Who benefits? *J. Insect Physiol.* 54, 297–308.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25, 402–408.
- Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J., 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487–501.
- López, J.H., Krainer, S., Engert, A., Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K., 2017. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. *Sci. Rep.* 7, 40853.
- Lourenço, A.P., Guidugli-Lazzarini, K.R., Freitas, F.C.P., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2013. Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.03.001>
- Mai, T.A., Doan, T.V., Tarradellas, J., de Alencastro, L.F., Grandjean, D., 2007. Dioxin contamination in soils of Southern Vietnam. *Chemosphere* 67, 1802–1807.
- Mann, R., Bidwell, J., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 193–199.
- Marmaras, V.J., Lampropoulou, M., 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell. Signal.* 21, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>

- Martin, S.J., 2001. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.* 38, 1082–1093.
- Marzaro, M., Vivan, L., Targa, A., Mazzon, L., Mori, N., Greatti, M., Petrucco Toffolo, E., Di Bernardo, A., Giorio, C., Marton, D., 2011. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bull. Insectology* 64, 119–126.
- Mason, R., Tennekes, H., Sánchez-Bayo, F., Jepsen, P.U., 2013. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *J. Env. Immunol Toxicol* 1, 3–12.
- Matolcsy, G., Nádasy, M., Andriska, V., 1989. *Pesticide chemistry*. Elsevier.
- Matsumoto, H., Tsuzuki, S., Date-Ito, A., Ohnishi, A., Hayakawa, Y., 2012. Characteristics common to a cytokine family spanning five orders of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.001>
- Mayer, F.L., Eilersieck, M.R., 1986. *Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals*. US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service Washington, DC.
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 247, C125–C142.
- McCormack, M.P., Gonda, T.J., 1997. Expression of Activated Mutants of the Human Interleukin-3/Interleukin-5/Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Common  $\beta$  Subunit in Primary Hematopoietic Cells Induces Factor-Independent Proliferation and Differentiation. *Blood* 90, 1471–1481.
- Medrzycki, P., Montanari, R., Bortolotti, L., Sabatini, A.G., Maini, S., Porrini, C., 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bull. Insectology* 56, 59–62.
- Menezes, H., Jared, C., 2002. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 132, 1–7. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00043-1)
- Metcalfe, D., 1986. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 67, 257–267.
- Mokarizadeh, A., Faryabi, M.R., Rezvanfar, M.A., Abdollahi, M., 2015. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol. Mech. Methods* 25, 258–278. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182>
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* 91, 549–599.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Mullin, C.A., Chen, J., Fine, J.D., Frazier, M.T., Frazier, J.L., 2015. The formulation makes the honey bee poison. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120, 27–35.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Pettis, J.S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS One* 5, e9754.
- Myllymäki, H., Rämetsä, M., 2014. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scand. J. Immunol.* 79, 377–385.

- Myllymäki, H., Valanne, S., Rämetsä, M., 2014. The *Drosophila* imd signaling pathway. *J. Immunol.* 192, 3455–3462.
- Nakashima, K., Yoshimura, T., Mori, H., Kawaguchi, M., Adachi, S., Nakao, T., Yamazaki, F., 2002. Effects of pesticides on cytokines production by human peripheral blood mononuclear cells--fenitrothion and glyphosate. *Chudoku Kenkyu Chudoku Kenkyukai Jun Kikanshi Jpn. J. Toxicol.* 15, 159–165.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R., 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 577–586.
- Nazzi, F., Brown, S.P., Annoscia, D., Del Piccolo, F., Di Prisco, G., Varricchio, P., Della Vedova, G., Cattonaro, F., Caprio, E., Pennacchio, F., 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog.* 8, e1002735.
- Negri, P., Maggi, M., Correa-Aragunde, N., Brasesco, C., Eguaras, M., Lamattina, L., 2013. Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie* 44, 575–585.
- Negri, P., Quintana, S., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L., Eguaras, M., 2014. *Apis mellifera* hemocytes generate increased amounts of nitric oxide in response to wounding/encapsulation. *Apidologie* 45, 610–617.
- Negri, P., Ramirez, L., Quintana, S., Szawarski, N., Maggi, M., Le Conte, Y., Lamattina, L., Eguaras, M., 2017. Dietary Supplementation of Honey Bee Larvae with Arginine and Abscisic Acid Enhances Nitric Oxide and Granulocyte Immune Responses after Trauma. *Insects* 8, 85. <https://doi.org/10.3390/insects8030085>
- Neumann, P., Carreck, N.L., 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.*
- Obana, H., Okihashi, M., Akutsu, K., Kitagawa, Y., Hori, S., 2002. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4464–4467.
- Özdemir, S., Altun, S., Arslan, H., 2018. Imidacloprid exposure cause the histopathological changes, activation of TNF- $\alpha$ , iNOS, 8-OHdG biomarkers, and alteration of caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 gene expression levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicol. Rep.* 5, 125–133.
- Park, S., Kim, K.M., Lee, J.H., Seo, S.J., Lee, I.H., 2007. Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect Immun* 75. <https://doi.org/10.1128/IAI.01473-06>
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565.
- Peña-Bautista, C., Baquero, M., Vento, M., Cháfer-Pericás, C., 2019. Free radicals in Alzheimer's disease: Lipid peroxidation biomarkers. *Clin. Chim. Acta* 491, 85–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.01.021>
- Pettis, J.S., Johnson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., Valko, M., 2017. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 592–607.

- Potts, S., Biesmeijer, K., Bommarco, R., Kleijn, D., Scheper, J., 2015. Status and trends of European pollinators. Key findings of the STEP project.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353.
- Proskocil, B., Lein, P., Jacoby, D., Fyer, A., 2014. Organophosphorus pesticides directly simulate macrophages to increase expression of growth factors and cytokines. *Eur. Respir. J.* 44, P4779.
- Qin, Z., 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221, 2–11.
- Ratiu, A.C., Neagu, A., Mihalache, M.R., Lazar, V., Evocoiu, A., 2016. Molecular and bioinformatics analysis of the relative expression profiles of dorsal, Toll-1, Relish and Duox genes in young versus old diutinus workers of *Apis mellifera*. *Rom Biotech Lett* 21, 11513–26.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G.-E., 2005. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 113, 716–720.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A.J., Zähringer, U., Seydel, U., Di Padova, F., 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8, 217–225.
- Rinkevich, F.D., Danka, R.G., Healy, K.B., 2017. Influence of Varroa Mite (*Varroa destructor*) Management Practices on Insecticide Sensitivity in the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Insects* 8, 9.
- Rivero, A., 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.* 22, 219–225.
- Roszell, L., Anderson, R., 1994. Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leukocyte subpopulations from *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 38, 195–206. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)90007-8)
- Salazar, K.D., Ustyugova, I.V., Brundage, K.M., Barnett, J.B., Schafer, R., 2008. A review of the immunotoxicity of the pesticide 3, 4-dichloropropionanilide. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 11, 630–645.
- Salmela, H., Amdam, G.V., Freitak, D., 2015. Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathog* 11, e1005015.
- Sampson, C.J., Amin, U., Couso, J.-P., 2013. Activation of *Drosophila* hemocyte motility by the ecdysone hormone. *Biol. Open* 2, 1412–1420.
- Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2016. Impacts of pesticides on honey bees, in: *Beekeeping and Bee Conservation-Advances in Research*. InTech.
- Sánchez-Bayo, F., Goka, K., 2005. Unexpected effects of zinc pyrethrin and imidacloprid on Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 74, 285–293.
- Sánchez-Bayo, F., Wyckhuys, K.A., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27.
- Sansone, P., Bromberg, J., 2012. Targeting the interleukin-6/Jak/stat pathway in human malignancies. *J. Clin. Oncol.* 30, 1005.
- Schechter, A., Quynh, H.T., Pavuk, M., Pöpke, O., Malisch, R., Constable, J.D., 2003. Food as a source of dioxin exposure in the residents of Bien Hoa City, Vietnam. *J. Occup. Environ. Med.* 45, 781–788.

- Schindler, C., Levy, D.E., Decker, T., 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* 282, 20059–20063.
- Schlüns, H., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Crozier, R.H., 2010. Infection with the trypanosome *Crithidia bombi* and expression of immune-related genes in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 705–709.
- Schmid, M.R., Brockmann, A., Pirk, C.W., Stanley, D.W., Tautz, J., 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 54, 439–444.
- Schneider, I., 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27, 353–365.
- Schröder, J.-M., 1999. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 56, 32–46. <https://doi.org/10.1007/s000180050004>
- Shearer, W.T., Rosenwasser, L.J., Bochner, B.S., Martinez-Moczygamba, M., Huston, D.P., 2003. Biology of common  $\beta$  receptor–signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.08.015>
- Shi, T.-F., Wang, Y.-F., Qi, L., Liu, F., Yu, L.-S., 2017. Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honeybee (*Apis mellifera*). *bioRxiv* 114256.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D.P., Krupke, C.H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J.D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J.P., Whitehorn, P.R., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>
- Singh, A.K., Jiang, Y., 2003. Lipopolysaccharide (LPS) induced activation of the immune system in control rats and rats chronically exposed to a low level of the organothiophosphate insecticide, acephate. *Toxicol. Ind. Health* 19, 93–108.
- Song, M.Y., Stark, J.D., Brown, J.J., 1997. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J.* 16, 2494–2500.
- Suchail, S., De Sousa, G., Rahmani, R., Belzunces, L.P., 2004a. In vivo distribution and metabolism of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag. Sci. Former. Pestic. Sci.* 60, 1056–1062.
- Suchail, S., Debrauwer, L., Belzunces, L.P., 2004b. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag. Sci.* 60, 291–296.
- Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L.P., 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482–2486.
- Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., Herrmann, N., 2010. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer’s disease. *Biol. Psychiatry* 68, 930–941.
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 197–205. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00098-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00098-8)

- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10520–10525.
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., Narat, M., 2017. Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and *Varroa mites* (*Varroa destructor*). *PLoS One* 12, e0187079.
- Tolnai, S., 1975. A method for viable cell count. *TCA Man. Tissue Cult. Assoc.* 1, 37–38. <https://doi.org/10.1007/BF00914435>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 247–268.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176.
- Turvey, S.E., Broide, D.H., 2010. Innate immunity. 2010 Primer Allerg. Immunol. Dis. 125, S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Valanne, S., Wang, J.-H., Rämetsä, M., 2011. The *Drosophila* toll signaling pathway. *J. Immunol.* 186, 649–656.
- Van den Brink, P.J., Van Smeden, J.M., Bekele, R.S., Dierick, W., De Gelder, D.M., Noteboom, M., Roessink, I., 2016. Acute and chronic toxicity of neonicotinoids to nymphs of a mayfly species and some notes on seasonal differences. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 128–133.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLOS ONE* 4, e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>
- VanEngelsdorp, D., Speybroeck, N., Evans, J.D., Nguyen, B.K., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Tarpy, D.R., 2010. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. *J. Econ. Entomol.* 103, 1517–1523.
- Vanha-aho, L.-M., Valanne, S., Rämetsä, M., 2016. Cytokines in *Drosophila* immunity. *Immunol. Lett.* 170, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.12.005>
- Victor, F., Gottlieb, A., 2002. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J. Drugs Dermatol. JDD* 1, 264–275.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vigues, B., Brunet, J.-L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550.
- Walderdorff, L., Laval-Gilly, P., Bonnefoy, A., Falla-Angel, J., 2018. Imidacloprid intensifies its impact on honeybee and bumblebee cellular immune response when challenged with LPS (lipopolysaccharide) of *Escherichia coli*. *J. Insect Physiol.* 108, 17–24.
- Weinhold, B., 2010. Mystery in a bottle: will the EPA require public disclosure of inert pesticide ingredients?
- Welchman, D.P., Aksoy, S., Jiggins, F., Lemaitre, B., 2009. Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. *Cell Host Microbe* 6, 107–114.

- Weldon, S.M., Mullen, A.C., Loscher, C.E., Hurley, L.A., Roche, H.M., 2007. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 18, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.04.003>
- Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., Genersch, E., 2008. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 10, 1612–1620.

### Site internet

EFSA - L'Autorité européenne de sécurité des aliments

[https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/Pesticides-ebook-180424.pdf](https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/Pesticides-ebook-180424.pdf)

consulté le 08/04/2019 à 16 :12

EPA – Environmental Protection Agency

<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>

consulté le 04/04/2019 à 14 :15

Safety Data Sheet Propylene carbonate

<https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=O43314&productDescription=PROPYLENE+CARBONATE+R+4L&vendorId=VN00033897&countryCode=US&language=en>

26 oct 2009

## 7. ANNEXES

**Annexe 1: Tableau des concentrations DL<sub>50</sub> des différentes espèces.**

LD 50	Species	molecule	type	Reference
4.5 ng - 81 ng/bee	Honeybee	Imidacloprid	oral ingestion	Nauen et al. 2001; Cresswell 2011
18 ng - 102 ng/bee	Honeybee	Imidacloprid	contact	Nauen et al. 2001; Iwasa et al. 2004
0.41 - 1.39 µg/g	Drosophila	Imidacloprid	oral ingestion	Shahid Arain et al. 2013
99500 ng/bee	Honeybee	6-chloronicotinic acid	oral ingestion	Nauen et al. 2001
>36, >49, >159 ng/bee	Honeybee	olefin-; 5-OH-;4,5-OH-imidacloprid	oral ingestion	Nauen et al. 2001
0.0037 µg/bee	Honeybee	imidacloprid:	oral acute 48h	Brandt et al. 2016
116 (3.7–490) ng/bee	honeybee	imidacloprid		Codling et al. 2016
60 ng/bee (600 mg/kg)	honeybee	imidacloprid	acute 48 h	Suchail et al. 2001
40 ng/bee	Honeybee	imidacloprid	acute 72 h	Suchail et al. 2001

**Annexe 2: Concentrations des néonicotinoïdes (Imidacloprid, clothianidin, thiacloprid et thiametoxam) ainsi que les métabolites d'imidacloprid (6-chloronicotinic acid, imidacloprid olefin et imidacloprid 5-hydroxy) dans le pollen, le miel et les abeilles. GB Grand Bretagne**

Pays	matrix	Pesticide	concentration max	unité	% de l'échantillons	Référence
Grèce	Pollen	Imidacloprid	73,9	ng/g		Kasiotis et al. (2014)
Grèce	Abeille	Imidacloprid	5,74	ng/g		Kasiotis et al. (2014)
France	Pollen	Imidacloprid	5,7	µg/kg	49,4	Chauzat et al. (2006)
France	Pollen	6-Chloronicotinic acid	9,3	µg/kg	44,4	Chauzat et al. (2006)
Grèce	Abeille	Clothianidin	39,9	ng/g	47,05	Kasiotis et al. (2014)
Grèce	Pollen	Clothianidin	1273	ng/g	40.0	Kasiotis et al. (2014)
USA	Pollen*	Imidacloprid	101	ng/g		Dively and Kamel (2012)
USA	Pollen*	Thiamethoxam	127	ng/g		Dively and Kamel (2012)
USA	Nectar	Imidacloprid	13,7	ng/g		Dively and Kamel (2012)
GB	Pollen de colza*	Thiamethoxam	0,0057	mg/kg	100	David et al. (2016)
GB	Pollen de colza*	Clothianidin	0,0036	mg/kg	73	David et al. (2016)
GB	Pollen de colza*	Thiacloprid	0,019	mg/kg	100	David et al. (2016)
Canada	Miel	Imidacloprid olefin	46,4	ng/g	11.8	Codling et al. (2016)
Canada	Miel	Imidacloprid 5-Hydroxy	71,4	ng/g	11.8	Codling et al. (2016)
Canada	Miel	Imidacloprid	32,1	ng/g		Codling et al. (2016)
Canada	Abeille	Imidacloprid 5-Hydroxy	5,6	ng/g		Codling et al. (2016)
USA	Abeille sauvage	imidacloprid	82	ng/g		Hladik et al. (2016)
USA	Pollen	Imidacloprid	206	ng/g	2,9	Mullin et al. (2010)
USA	Pollen	Imidacloprid olefin	554	ng/g	0,3	Mullin et al. (2010)
USA	Pollen	Imidacloprid 5-Hydroxy	152	ng/g	0,3	Mullin et al. (2010)

\*pollen prélevé directement des fleurs



**Annexe 3 : Analyses statistiques de la viabilité cellulaire, IMI imidaclopride, CON Confidor vert, activation immunitaire avec LPS en  $\mu\text{g/mL}$ .**

CELL VIABILITY	Variable	Pesticide	Time	Statistical test	p-value	N
Abeille	0 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	0,182	6
	0 LPS	CON	24	ANOVA	0,992	8
	1 LPS	CON	24	ANOVA	0,802	7
	10 LPS	CON	24	ANOVA	0,936	7
Bourdon	0 LPS	IMI	24	ANOVA (arcsin)	0,155	10
	1 LPS	IMI	24	ANOVA (arcsin)	0,706	4
	10 LPS	IMI	24	ANOVA (arcsin)	<b>0,017</b>	4
	0 LPS	CON	24	ANOVA	0,964	9
	1 LPS	CON	24	ANOVA	0,591	8
	10 LPS	CON	24	ANOVA	0,978	8
THP-1	0 LPS	IMI	5	ANOVA (log)	0,88	9
	0 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	0,857	9
	0 LPS	CON	24	ANOVA	0,058	3
	0,1 LPS	CON	24	ANOVA	0,196	3
	1 LPS	CON	24	ANOVA	0,453	3
Drosophila S2	0 LPS	IMI	5	ANOVA	0,233	9
	0 LPS	IMI	24	ANOVA	0,48	9

**Annexe 4: Tableau des tests statistiques pour la phagocytose des cellules exposées à l'IMI ou Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.**

Phagocytose	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
Abeille	0 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>&lt; 0,0001</b>	9
	1 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0010</b>	9
	10 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0014</b>	7
	0 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0004</b>	10
	1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0465</b>	7
	10 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0466</b>	10
< 20 billes	0 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0155</b>	4
< 20 billes	1 LPS	CON	5	ANOVA	<b>0,0054</b>	7
< 20 billes	10 LPS	CON	5	ANOVA	<b>0,0010</b>	10
Bourdon	0 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>&lt; 0,0001</b>	9
	1 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>&lt; 0,0001</b>	9
	10 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	<b>0,0002</b>	8
	0 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	<b>0,0115</b>	5
	1 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	<b>0,0063</b>	7
	10 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	<b>0,0040</b>	7
	0 LPS	CON	5	ANOVA	0,5617	6
	1 LPS	CON	5	ANOVA	0,6168	6
	10 LPS	CON	5	ANOVA	0,2850	6
< 20 billes	0 LPS	CON	5	ANOVA	0,1980	6
< 20 billes	1 LPS	CON	5	ANOVA	0,1547	6
< 20 billes	10 LPS	CON	5	ANOVA	0,0686	6
Drosophile S2	0 LPS	IMI	24	ANOVA	0,22169011	3
	1 LPS	IMI	24	ANOVA	<b>&lt; 0,0001</b>	3
	0 LPS	IMI	5	ANOVA	<b>0,04530322</b>	3
	1 LPS	IMI	5	ANOVA	<b>0,00309685</b>	3
THP- 1	0 LPS	IMI	5	ANOVA	0,16093988	3
	0,1 LPS	IMI	5	ANOVA	0,62380868	3
	1 LPS	IMI	5	ANOVA	0,07032644	3
	0 LPS	IMI	24	ANOVA	0,10188639	3
	0,1 LPS	IMI	24	ANOVA	<b>0,03675971</b>	3
	1 LPS	IMI	24	ANOVA	<b>0,03843669</b>	3

**Annexe 5: Tableau des tests statistiques pour les analyses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des hémocytes d'abeille et de bourdon exposées à l'IMI et au Confidor vert (CON, activation immunitaire avec LPS en µg/mL).**

H2O2	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
Abeille	0 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	0,001701	8
	1 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	0,006092	8
	10 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	< 0,0001	8
	0 LPS	CON	3	ANOVA	< 0,0001	10
	1 LPS	CON	3	ANOVA	< 0,0001	10
	10 LPS	CON	3	ANOVA	< 0,0001	10
Bourdon	0 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	0,91297	10
	1 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	0,831523	10
	10 LPS	IMI	3	Kruskal-Wallis	< 0,0001	10
	0 LPS	CON	3	ANOVA	0,010188	14
	1 LPS	CON	3	ANOVA	0,424811	6
	10 LPS	CON	3	ANOVA	0,532704	6

**Annexe 6: Tableau des tests statistiques pour les analyses de NO des cellules exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.**

NO	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
THP-1	0 LPS	CON	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0,1 LPS	CON	0,5	Kruskal-Wallis	0,000415	24
	1 LPS	CON	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0 LPS	CON	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0,1 LPS	CON	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	1 LPS	CON	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0,1 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	1 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0 LPS	IMI	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0,1 LPS	IMI	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	1 LPS	IMI	0,5	Kruskal-Wallis	0,000365	24
	0 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	0,1 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
	1 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24
0 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24	
0,1 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24	
1 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	24	
Abeille	0 LPS	IMI	0,5	ANOVA	< 0,0001	11
	1 LPS	IMI	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	12
	10 LPS	IMI	0,5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	12
	0 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	0,000677	11
	1 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	0,001644	11
	10 LPS	IMI	1	Kruskal-Wallis	0,001788	11
	0 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	0,001226	11
	1 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	0,002343	11
	10 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	0,00293	11
	0 LPS	CON	0,5	ANOVA	< 0,0001	12
	1 LPS	CON	0,5	ANOVA	< 0,0001	12
	10 LPS	CON	0,5	ANOVA	< 0,0001	12
	0 LPS	CON	1	ANOVA	< 0,0001	12
	1 LPS	CON	1	ANOVA	< 0,0001	12
	10 LPS	CON	1	ANOVA	< 0,0001	12
0 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	15	
1 LPS	CON	2	ANOVA	< 0,0001	12	
10 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	12	
Bourdon	0 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	12
	0,1 LPS	CON	2	ANOVA	< 0,0001	12
	1 LPS	CON	2	Kruskal-Wallis	< 0,0001	15
	0 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	0,01558	9
	0,1 LPS	IMI	2	ANOVA	< 0,0001	9
1 LPS	IMI	2	Kruskal-Wallis	0,000182	9	

**Annexe 7 : Tableau des tests statistiques pour les analyses des protéines des hémocytes d'abeilles exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.**

Protein	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
Basket	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0083	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0048	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0086	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,1542	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,3186	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,9811	4
TEP-A	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0182	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0297	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0182	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,5303	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0152	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,8474	4
Spätzle	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,2217	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,1114	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,1827	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,8815	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0489	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0457	4
relish	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0395	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0039	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0618	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,3104	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,6413	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,9376	4
myD88	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,1400	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,053413	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,6331	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,3699	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,5232	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,6256	4
Defensin	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,2138	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0120	4
	10 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0335	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,3822	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,5126	4
	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,1650	4

**Annexe 8: Tableau des tests statistiques pour les analyses des protéines des hémocytes de bourdons exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL.**

Protein	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
relish	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,5298	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0231	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0883	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0589	4
TEP-A	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,6209	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,0381	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,1411	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,3863	4
Defensin	10 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,0670	4
	0 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,5004	4
	1 LPS	IMI	18	Kruskal-Wallis	0,2018	4
	0 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,2839	4
	1 LPS	CON	18	Kruskal-Wallis	0,2052	4

**Annexe 9: Tableau des tests statistiques pour les analyses des cytokines de cellules THP-1 exposées à l'IMI ou au Confidor vert (CON), activation immunitaire avec LPS en µg/mL, LOD Limites de détection.**

Cytokine	Variable	Pesticide	Time (h)	Statistical test	p-value	N
IL-6	0,05 LPS	IMI	24	ANOVA	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	24	ANOVA	< 0,0001	9
	1 LPS	IMI	24	ANOVA	< 0,0001	9
	0,05 LPS	IMI	5	ANOVA	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	5	ANOVA	0,1590	9
	1 LPS	IMI	5	ANOVA	0,2870	9
	0,05 LPS	CON	5	ANOVA	0,8720	9
	0,1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	0,9668	9
	1 LPS	CON	5	ANOVA	0,0187	9
	0 LPS	CON	24			9
	0,1 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
TNF-alpha	0,05 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	0,0002	9
	0,05 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0 LPS	CON	5			9
	0,1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0 LPS	CON	24			9
	0,1 LPS	CON	24	ANOVA	< 0,0001	9
	1 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
GM-CSF	0,05 LPS	IMI	5	ANOVA	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	IMI	5	ANOVA	0,0035	9
	0,05 LPS	IMI	24	ANOVA	< 0,0001	9
	0,1 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	IMI	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0,05 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	0,0138	9
	0,1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	1 LPS	CON	5	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0,05 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9
	0,1 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	0,0001	9
	1 LPS	CON	24	Kruskal-Wallis	< 0,0001	9





Étude comparative de la réactivité des cellules du système immunitaire  
(invertébré et vertébré) vis-à-vis des pesticides

---

## Résumé

Les insectes, en particulier les pollinisateurs, sont en train de disparaître. Il a été démontré que les insecticides néonicotinoïdes affaiblissent les abeilles. Avec les pathogènes comme les bactéries, ils composent un cocktail mortel pour les insectes. Les abeilles contaminées sont plus susceptibles de mourir d'une infection bactérienne que les abeilles non contaminées. L'imidaclopride (IMI), le plus courant de ces insecticides, a aussi été trouvé sur les fruits et légumes que nous consommons. Cette thèse étudie l'impact de l'IMI sur la réactivité des cellules immunitaires de quatre espèces différentes (abeille, bourdon, drosophile et Homme). Les cellules ont été exposées à l'IMI, la molécule toxique de l'insecticide, et au Confidor vert, sa formulation commerciale appliquée sur les plantes. Les cellules contaminées par l'IMI ont également été exposées aux LPS, des composants de la membrane des bactéries, pour étudier leur réponse immunitaire à une activation immunitaire bactérienne.

## Abstract

Insects, especially pollinators, are declining in an alarming pace. Neonicotinoid insecticides have been shown to weaken honeybees. Together with pathogens like bacteria and viruses they compose a lethal cocktail to pollinators. Bees contaminated with these insecticides are more likely to die of a bacterial infection than uncontaminated bees. But not only insects are exposed to neonicotinoids. Imidacloprid (IMI), the most common of these insecticides, has been found on fruits and vegetables that we consume. In this study we investigate the impact of IMI on the reactivity of immune cells of four different species (honeybee, bumblebee, drosophila and human). Cells were exposed to IMI, the toxic molecule of the insecticide, and to Confidor vert, the commercial formulation of IMI in which it is applied on plants. IMI contaminated cells were further exposed to LPS, a component of the outer membrane of bacteria, to study their immune response to a bacterial immune activation.