



HAL
open science

La toxicogénomique pour la recherche et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet aux pesticides : approche non-ciblée utilisant le volatolome de l'abeille domestique *Apis mellifera* ; approche ciblée utilisant le gène *tspo* chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*

Vincent Fernandes

► **To cite this version:**

Vincent Fernandes. La toxicogénomique pour la recherche et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet aux pesticides : approche non-ciblée utilisant le volatolome de l'abeille domestique *Apis mellifera* ; approche ciblée utilisant le gène *tspo* chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Clermont Auvergne, 2024. Français. NNT : 2024UCFA0007 . tel-04573894

HAL Id: tel-04573894

<https://theses.hal.science/tel-04573894>

Submitted on 13 May 2024

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.

Ecole Doctorale Science de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement

THESE

Présentée à l'Université Clermont Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Microbiologie

Soutenue publiquement le 17 Janvier 2024 à Clermont-Ferrand par

Vincent FERNANDES

La toxicogénomique pour la recherche et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet aux pesticides : approche non-ciblée utilisant le volatolome de l'abeille domestique *Apis mellifera* ; approche ciblée utilisant le gène *tspo* chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*

Membres du jury :

Rapporteurs : Dr Fabrice Martin-Laurent, Directeur de recherche
UMR Agroécologie, INRAE, Dijon

Dr Claude Collet, Chargé de recherche
UR Abeilles et Environnement, INRAE, Avignon

Examineurs : Dr Pascale Besse-Hoggan, Directrice de recherche, Présidente du jury
UMR ICCF, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

Dr Hélène Tricoire-Leignel, Maître de conférences des Universités
UMR MITOVASC, CNRS-INSERM, Angers

Invité : Dr Charlène Leneveu-Jenvrin, Chargée d'étude
ADIV, Clermont-Ferrand

Direction de la thèse : Pr Isabelle Batisson, Professeure des Universités
UMR LMGE, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

Dr Philippe Bouchard, Maître de conférences des Universités
UMR LMGE, UCA-CNRS, Clermont-Ferrand

UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
Equipe Communautés Microbiennes : Ecotoxicologie - Santé



Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner mes travaux de thèse. Merci aux Dr Fabrice Martin-Laurent et Claude Collet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, et merci aux Dr Pascale Besse-Hoggan, Dr Hélène Tricoire-Leignel et Dr Charlène Leneveu-Jenvrin et d'avoir accepté de rejoindre mon jury en tant qu'examineurs et invité. Je remercie également le Dr Cyril Jousse, le Dr Davide Degli-Esposti, le Dr Erwan Engel et le Dr Luc Belzunces pour leur implication dans mes comités de suivi de thèse au cours desquels nous avons eu des échanges scientifiques très stimulants.

Un grand merci à Isabelle, sans laquelle cette thèse n'aurait probablement jamais vu le jour, tu as accepté d'être ma directrice pendant plus de deux ans le temps que Philippe se décide enfin à passer son HDR. Merci pour ta disponibilité, ta réactivité et pour tous les échanges que nous avons eu ces trois dernières années.

Bon, maintenant c'est ton tour Philippe ! Mis bout à bout cela fait plus de quatre ans que l'on travaille ensemble. Merci pour la confiance que tu m'as accordée pendant tout ce temps et pour avoir accepté de m'encadrer pendant mes stages de master 1 et 2 (même si le COVID a un peu compliqué le deuxième) et d'avoir développé ce sujet de thèse avec moi. Après plus de deux ans de thèse je peux enfin dire que tu es mon co-directeur, il en aura fallu du temps pour en voir le bout de cette HDR ! Merci pour tous les bons moments qu'on a passés dans le bureau 132, il faut reconnaître qu'on s'est quand même bien marré ces trois dernières années. Merci pour tous les échanges scientifiques et pour avoir toujours respecté mes choix sans jamais rien m'imposer, je sais qu'hélas tout le monde n'a pas ce luxe. Merci pour m'avoir transmis ta passion pour l'enseignement et pour la médiation scientifique, j'espère que je vais pouvoir continuer à y consacrer du temps dans le futur.

Je remercie bien évidemment le Pr Christiane Forestier pour m'avoir accueilli, il y a maintenant bien longtemps, dans l'équipe CMES pour mes stages de master. Son énergie débordante et sa bienveillance ont été de réels soutiens, notamment pendant les périodes de confinement où elle s'acharnait à maintenir le lien (à distance bien sûr) entre les membres de l'équipe. Je remercie également les Pr Téléphore Sime-Ngando et Didier Debroas de m'avoir accueilli au sein du LMGE pour ma thèse. Vos blagues et jeux de mots risquent de beaucoup me manquer Didier !

Je remercie, bien évidemment, tous les collègues de l'équipe CMES, qu'ils soient passés ou présents, pour leur gentillesse et leur accueil. Un merci spécial à Geneviève et Florence pour tous les moments que nous avons passés ensemble autour d'un café et pour avoir toujours pris le temps de me donner un coup de main quand j'avais besoin d'un conseil ou d'un appui technique. Je suis très heureux de vous avoir rencontré et côtoyé pendant ces trois années de thèse ! Même si je dois reconnaître que Geneviève m'a entraîné sur de nombreux plans un peu curieux notamment en Com.

Je remercie également les Dr Erwan Engel et Jérémy Ratel et l'ensemble de l'équipe MASS pour leur regard bienveillant, leur travail et leur aide précieuse autour de la volatolomique.

Merci au Pr Frédéric Delbac, aux Drs Marie Diogon et Kevin Hidalgo qui m'ont permis d'exploiter les données de leur étude sur le volatolome de l'abeille, et sans lesquelles mon stage de master 2 et ma thèse auraient été bien différents. J'en profite aussi pour remercier tous les membres de l'équipe IHP (la deuxième équipe la plus cool du premier étage) pour tous les

moments que l'on a passés ensemble et pour m'avoir accueilli si souvent dans votre équipe et pour les conseils et l'aide que vous nous avez apporté pour développer le projet abeille-COV.

Au cours de ma thèse j'ai eu l'occasion d'encadrer et co-encadrer des étudiants de divers horizons qui m'ont permis de me former à cet exercice difficile (et parfois périlleux) qu'est l'encadrement et qui ont permis à mes travaux d'avancer plus sereinement. Je remercie donc Marine Suchet pour son implication très active dans le projet abeille-COV (et je te souhaite bon courage et beaucoup de réussite pour ta thèse), Mathilde Aubry, Maxence Garcia, Fatima Faris et Imane Souki pour leurs implications dans le projet tspo et je remercie Simon Ayzac et Gulchokra Dousouieva pour leur implication dans le projet microplastique-Paramecium.

Merci aux doctorants du premier étage (sans oublier Yoyo et Damien bien sûr), qu'ils soient passés ou présents (Juliette, Clémentine, Eugénie, Roxanne, Maurine pour ne citer que vous) pour tous les fous rires, les repas, les verres et les soirées que nous avons passés ensemble. Je vous souhaite le meilleur que ce soit personnel ou professionnel. Merci également à Antoine, Éric, Clémentin, Thomas, Julien, Léa, Fred, Arthur, Pierre-Louis, Maxime, Hélène, Fanny, Marine et Marina pour tous les moments partagés avec vous. Et bien évidemment merci à Ivan, et oui je t'ai mis avec les doctorants car pour moi tu es et restera un vieux doctorant, pour tes traits d'humour du midi, parfois un peu border certes mais après tout ce qui se passe dans la salle 128 reste dans la salle 128.

Laurianne, comment oublier Laurianne et son rire si caractéristique et communicatif. Toi et moi ça commence à être une longue histoire, ma première voisine de bureau. Merci pour nos séances de défoulement pendant lesquelles on a râlé sans vergogne (des heures probablement à l'échelle de ces 3 années et demie passées) et pour tous les M&M's troqués. Merci pour tous nos échanges scientifiques et personnels et pour tous les conseils que tu m'as donnés. Je te souhaite de trouver rapidement un poste pour pouvoir t'épanouir pleinement avec tes deux petits monstres, tu le mérites sans aucun doute que ce soit humainement ou professionnellement. Je peux te le dire maintenant ... t'inquiète pas après plus de trois ans d'effort ton papier abeille va finir par être publié.

Un grand merci à Régi (alias la plus belle blonde que je n'ai jamais vu de ma vie, il paraît que je t'ai même porté sur mon épaule) pour ta gentillesse, ton insouciance et ta soif de découverte. Tu es sans aucun doute l'une des plus belles rencontres que j'ai fait ces dernières années. J'espère que tu garderas cet état d'esprit pendant encore longtemps, ça me laisse à penser que le monde n'est pas si mal embraqué que ça finalement. Je vous souhaite le meilleur à toi et à Chloé.

Un grand merci à Thania (ou Than's pour les intimes), ma collègue de master, qui a accepté il y a trois ans maintenant de me suivre dans ce projet un peu fou sur les COV. Ce projet n'aurait clairement pas été possible sans toi, tes connaissances et compétences. On s'est quand même bien marré pendant ces trois étés à s'occuper de nos abeilles même si on a eu des petits moments de craquage. J'en profite aussi pour faire une petite bise (ou un grand salut) à Julian. Je vous souhaite le meilleur à tous les deux.

Un grand merci à Lucie alias Lulu (aux mille et un adjectifs). Ma seconde voisine de bureau et compatriote Bourbonnaise. Trois ans qu'on se marre tous les jours (enfin presque) sans aucune retenue. Je reconnais bien volontiers que je risque de beaucoup m'ennuyer sans toi (je pense que même le couloir de CMES va s'ennuyer sans toi). Merci pour toutes les

discussions que nous avons eues ensemble, j'y ai toujours pris beaucoup de plaisir. Merci pour toutes les fois où tu m'as trimbalé comme tu le dis si bien. Trois ans de passés et une nouvelle bosse de roulée ! Je te souhaite le meilleur que ce soit personnellement ou professionnellement, tu le mérites !

Je remercie évidemment tous mes amis (Jéjé, Nico, Sarah, Gaël, Omaïma, Sylvain, Carolina, Staacy, Alex, Zoé et Nico pour ne citer que vous), qui me supportent depuis tant d'années, merci à vous pour tout ce que vous m'avez apporté.

Et enfin, un grand merci à mes nièces, à mes frangins, à ma frangine et à mes parents qui ont tout fait pour que je réussisse. Je vous aime !!

“Un auteur ne nuit jamais autant à ses lecteurs que quand il dissimule une difficulté”

“Malheureusement, ce qui est peu reconnu, c’est que les livres scientifiques les plus valables sont ceux où l’auteur indique clairement ce qu’il ne sait pas”

Evariste Galois (1811-1832)

Résumé étendu

Titre :

La toxicogénomique pour la recherche et la caractérisation de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet aux pesticides : approche non-ciblée utilisant le volatolome de l'abeille domestique *Apis mellifera* ; approche ciblée utilisant le gène *tspo* chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.

Résumé étendu :

L'évaluation de l'impact des pesticides sur l'environnement a longtemps été restreinte à des mesures chimiques visant à détecter et quantifier les résidus de pesticides et leurs métabolites dans les différents compartiments de la biosphère. Ces données donnaient un aperçu de l'état de contamination chimique des milieux mais ne permettaient pas d'évaluer les effets de l'exposition aux xénobiotiques sur les organismes. La toxicologie pallie ces manques en abordant, la caractérisation des xénobiotiques, la détermination de leurs modes d'action et l'évaluation du risque qui leur est associé. Cependant, les analyses toxicologiques sont trop souvent ciblées et ne s'intéressent qu'à un nombre réduit de descripteurs (gènes, protéines ou métabolites) dans une même analyse. Elles ne permettent donc pas de déterminer les mécanismes biologiques impliqués dans la reconnaissance et la réponse à une perturbation de manière exhaustive. Les approches omiques représentent une bonne alternative pour apprécier les dommages et évaluer la réponse globale des organismes soumis à des stress. Des modifications du transcriptome, du protéome ou du métabolome peuvent permettre de mettre en évidence de potentiels biomarqueurs d'exposition ou d'effet à un xénobiotique. Ces techniques dites à haut débit permettent donc de caractériser une réponse plus complète de l'organisme et définissent une nouvelle branche de la toxicologie : la toxicogénomique. Ainsi, des signatures témoignant de l'exposition à différents pesticides ont pu être mises en évidence chez deux bactéries du sol *via* une approche nouvellement utilisée dans un contexte écotoxicologique : la volatolomique (Hidalgo *et al.*, 2019).

La première partie de mes travaux de thèse a eu pour objectif de poursuivre cette preuve de concept en validant l'utilisation de cette approche sur un auxiliaire non-microbien des écosystèmes : *Apis mellifera*. Une signature volatile témoignant d'une exposition chronique à l'insecticide fipronil a été mise en évidence chez l'abeille. Les composés constituant cette signature ont pu être identifiés, en partie, et sont essentiellement classés comme étant des composés ayant une activité sémiocchimique. Seul un métabolite, le 2,6-diméthylcyclohexanol, est décrit comme étant un modulateur des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique.

La seconde partie de mes travaux s'est intéressée à la valorisation de deux composés volatils mis en évidence chez l'abeille, le 2,6-diméthylcyclohexanol et le 1-octen-3-ol, du fait de leur activité neurotropic sur les GABA-R. L'hypothèse de travail considérait que ces composés, produits par l'abeille, pourraient avoir un effet bénéfique dans le cas d'une exposition au fipronil. Ainsi, une étude de toxicité, a montré que ces composés ne sont pas toxiques pour l'abeille dans le cas d'une exposition chronique par voie trophique. Lors des études de co-exposition du 1-octen-3-ol et du fipronil, un effet bénéfique du composé volatil a pu être observé sur la survie des abeilles exposées à l'insecticide.

La troisième partie de mes travaux a porté sur une étude ciblée de l'expression du gène *tspo* chez la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens* soumis à différents stress pesticides. Ce gène, initialement mis en évidence chez le protiste cilié *Paramecium tetraurelia* comme étant un biomarqueur potentiel de l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes, s'est montré être un marqueur de stress généraliste des pesticides chez *P. fluorescens* plutôt qu'un marqueur spécifique de l'exposition aux pyréthrinoïdes.

Mes travaux de thèse montrent que les approches de toxicogénomique et d'écotoxicogénomique sont pertinentes pour obtenir de nouvelles pistes de biomarqueurs associés à différents niveaux trophiques et à différents stress. Leurs validations et valorisations restent toutefois des défis scientifiques et techniques qui doivent être engagés avant l'obtention de nouvelles solutions permettant l'identification et le suivi des contaminations dans l'environnement.

Mots-clés :

Pesticides; Pyréthrinoïdes; Fipronil; Biomarqueur; TSPO; *Apis mellifera*; *Pseudomonas fluorescens*; Composés Organiques Volatils; Volatolomique; Toxicologie environnementale; Toxicogénomique; Ecotoxicologie microbienne

Co-direction de thèse :

Pr Isabelle BATISSON et Dr Philippe BOUCHARD.

Laboratoire d'accueil :

UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Equipe Communautés Microbiennes : Ecotoxicologie - Santé, Université Clermont Auvergne, Aubière, France.

Financements :

Les travaux proposés dans ce manuscrit de thèse ont été financés par :

- le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation;
- le Contrat Plan Etat Région (projet SYMBIOSE) et la région Auvergne-Rhône-Alpes;
- l'Agence Nationale de la Recherche (projet BEELOSS);
- la Fédération Française des Recherches en Environnement (projet « Détermination du potentiel thérapeutique de composés organiques volatiles comme traitement contre l'impact des insecticides chez l'abeille »);
- l'UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (projet : « Utiliser la compétition de composés organiques volatiles pour les récepteurs neuronaux des pesticides chez l'abeille. Exploration d'un traitement préventif par recherche translationnelle »).

Extended abstract

Title:

Toxicogenomics for research and characterization of new biomarkers of exposure or effect to pesticides: non-targeted approach using the volatolome of the honeybee *Apis mellifera*; targeted approach using the *tspo* gene in the bacterium *Pseudomonas fluorescens*.

Extended abstract:

Assessment of pesticides impacts on the environment has long been restricted to chemical measurements aimed at detecting and quantifying residues of pesticide and their metabolites in the various compartments of the biosphere. These data provided an overview of the state of chemical contamination of the environment, but did not allow us to assess the effects of xenobiotic exposure on the biotic component of the environment. Toxicology offset these shortcomings by characterizing xenobiotics, determining their modes of action and assessing the associated risk. However, toxicological analyses are often too targeted, focusing on a limited number of descriptors (genes, proteins or metabolites) in a single analysis. They are therefore unable to determine the biological mechanisms involved in the recognition and response to a given disturbance in an exhaustive way. Omics approaches represent a good alternative for assessing damage and evaluating the overall response of organisms exposed to stress. Modifications of the transcriptome, proteome or metabolome of an organism can reveal potential biomarkers of exposure or effect to a xenobiotic. These so-called high-throughput techniques enable us to characterize a more complete organism response, and define a new branch of toxicology: toxicogenomics. For example, signatures of exposure to various pesticides have been identified in two soil bacteria using a new approach in an ecotoxicological context: volatolomics (Hidalgo *et al.*, 2019).

The first part of my PhD aimed to pursue this proof of concept by validating the use of this approach on a non-microbial ecosystem auxiliary: *Apis mellifera*. In this context, a volatile signature reflecting chronic exposure to the insecticide fipronil was revealed in honeybees. The compounds making up this signature have been identified, in part, and are essentially classified as having semiochemical activity. Only one compound, 2,6-dimethylcyclohexanol, is described as a modulator of γ -aminobutyric acid receptors.

The second part of my work focused on the valorization of two volatile compounds identified in honeybees, 2,6-dimethylcyclohexanol and 1-octen-3-ol, due to their neurotropic activity on GABA-Rs. The working hypothesis was that these compounds, produced by the bee,

could have a beneficial effect in the case of chronic exposure to fipronil. A toxicity study, showed that these compounds are not toxic to bees in the case of chronic trophic exposure. In co-exposure studies with 1-octen-3-ol and fipronil, a beneficial effect of the volatile compound was observed on the survival of bees exposed to the insecticide.

The third part of my work involved on a targeted study of the *tspo* gene expression in the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* exposed to various pesticide stresses. This gene, initially identified in the ciliated protist *Paramecium tetraurelia* as a potential biomarker of exposure to pyrethroid insecticides, turned out to be a general pesticide stress marker in *P. fluorescens* rather than a specific marker of pyrethroid exposure.

My PhD work shows that toxicogenomic and ecotoxicogenomic approaches are relevant for identifying potential new biomarkers associated with different trophic levels and stresses. However, their validation and valorization remain scientific and technical challenges that must be taken up to obtain new solutions allowing the identification and monitoring of contamination in the environment.

Keywords:

Pesticides; Pyrethroids; Fipronil; Biomarker; TSPO; *Apis mellifera*; *Pseudomonas fluorescens*; Volatile Organic Compounds; Volatolomic; Environmental toxicology; Toxicogenomic; Microbial ecotoxicology

PhD supervisors:

Pr Isabelle BATISSON et Dr Philippe BOUCHARD.

Host laboratory:

UMR CNRS 6023, Laboratory Microorganisms: Genome and Environment, Microbial Communities: Ecotoxicology - Health team, Clermont Auvergne University, Aubière, France.

Funding:

The work proposed in this PhD manuscript was funded by:

- the French ministry of higher education, research and innovation;
- the Contrat Plan Etat Région (SYMBIOSE project) and the Auvergne-Rhône-Alpes region;
- the French National Research Agency (BEELOSS project);
- the French Federation for Environmental Researches (project: “Determination of the therapeutic potential of volatile organic compounds as a treatment against the impact of insecticides on bees”);
- the UMR CNRS 6023 Laboratory Microorganisms: Genome and Environment (project: “Using the competition of volatile organic compounds for neuronal pesticide receptors in bees. Exploring a preventive treatment through translational research”).

Productions scientifiques

Le nom du (ou des) présentateur(s) est (sont) souligné(s).

Communications auprès du grand public :

Bouchard, P. ; Monjot, A. ; Fernandes, V. ; Donnadiou-Bernard, F. et Bricheux, G. Diversité microbienne et réseau trophique aquatique. **Fête de la science**. Clermont-Ferrand, France. Octobre 2021.

Fernandes, V. et Morey, C. Le paysage, la pollution et le recyclage. **Dispositif ASTEP**. Ecole primaire Philippe Arbos. Clermont-Ferrand, France. Janvier-Juin 2022.

Fernandes, V. et Morey, C. Le monde des abeilles. **Dispositif ASTEP**. Ecole primaire Philippe Arbos. Clermont-Ferrand, France. Janvier-Juin 2022.

Fernandes, V. ; Batisson, I. et Bouchard, P. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet des phytosanitaires par une approche écotoxicogénomique. **Table Ronde « Comment des démarches agricoles soucieuses de la santé et du climat peuvent et doivent créer de la valeur sur nos territoires ? »**, Clermont Innovation Week. Clermont-Ferrand, France. 14 Avril 2022.

Fernandes, V. ; Gaume, L. ; Lesobre, J. et Donnadiou-Bernard, F. Epuration des eaux quèsaco : diversité, fonctions et risque associés aux microorganismes. **Fête de la science**. Clermont-Ferrand, France. Octobre 2022.

Communications au sein du pôle scientifique clermontois :

Fernandes, V. ; Batisson, I. et Bouchard, P. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet des phytosanitaires par une approche écotoxicogénomique. **Journée Des Doctorants du LMGE**. Clermont-Ferrand, France. 17 Juin 2021.

Fernandes, V. ; Ratel, J. ; Batisson, I. ; Engel, E. et Bouchard, P. Volatolomics : a relevant approach for toxicological and ecotoxicological experiments. **Journée de l'Ecole Doctorale**. Clermont-Ferrand, France. 18 et 19 Mai 2022.

Fernandes, V. ; Batisson, I. et Bouchard, P. A GABA receptor modulator and semiochemical compounds evidenced by volatolomics as candidate markers of chronic exposure to fipronil in *Apis mellifera*. **Journée Des Doctorants du LMGE**. 11 et 12 Juillet 2023.

Communications orales dans des congrès scientifiques nationaux et internationaux :

Fernandes, V. ; Ratel, J. ; Batisson, I. ; Engel, E. et Bouchard, P. Volatolomics : a relevant approach for toxicological and ecotoxicological experiments. **EcotoxicomicYR 2021**. Webinaire. 29 Novembre 2021.

Fernandes, V. ; Ratel, J. ; Batisson, I. ; Engel, E. et Bouchard, P. Approches toxicogénomiques chez *Paramecium*. **Congrès Microeucaryotes de l'Association Française d'Ecologie Microbienne**. Clermont-Ferrand, France. 23 Juin 2022.

Fernandes, V. ; Hidalgo, K. ; Diogon, M. ; Ratel, J. ; Batisson, I. ; Delbac, F. ; Engel, E. et Bouchard, P. Highlighting new toxicity biomarkers using volatolome deviation analysis in *Apis mellifera* chronically exposed to fipronil. **12^{ème} Congrès Européen d'Entomologie**. Héraklion, Crète, Grèce. 16 au 20 Octobre 2023.

Communications affichées dans des congrès scientifiques nationaux et internationaux :

Fernandes, V. ; Batisson, I. et Bouchard, P. Approche de toxicogénomique microbienne et biomarqueurs de toxicité. **Congrès Microbiote de la Société Française de Microbiologie**. Montpellier, France. 03 au 05 Octobre 2022.

Fernandes, V. ; Batisson, I. ; Ratel, J. ; Engel, E. et Bouchard, P. Deciphering new exposure biomarkers in ciliates and bacteria exposed to pyrethroids by transcriptomic and volatolomic analysis. **Ecotoxicomic 2022**. Montpellier, France. 15 au 18 Novembre 2022.

Sbaghdi, T. et Fernandes, V. ; Suchet, M. ; Ratel, J. ; Batisson, I. ; Engel, E. ; Delbac, F. et Bouchard, P. Determination of the toxicity of two volatile organic compounds and their

potential beneficial effect in the case of chronic exposure to fipronil in *Apis mellifera*. **12^{ème} Congrès Européen d'Entomologie**. Héraklion, Crète, Grèce. 16 au 20 Octobre 2023.

Publications scientifiques :

Article publié :

Fernandes, V. ; Hidalgo, K. ; Diogon, M. ; Mercier, F. ; Angénieux, M. ; Ratel, J. ; Delbac, F. ; Engel, E. et Bouchard, P. A GABA Receptor Modulator and Semiochemical Compounds Evidenced Using Volatolomics as Candidate Markers of Chronic Exposure to Fipronil in *Apis mellifera*. *Metabolites*. 2023, 13, 185. <https://doi.org/10.3390/metabo13020185>

Articles en préparation :

Fernandes, V. et Sbaghdi, T. ; Suchet, M. ; Delbac, F. et Bouchard, P. Potential beneficial effect of two GABA-receptor modulators, 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol, in *A. mellifera* chronically exposed to low doses of fipronil.

Fernandes, V. ; Garcia, M. ; Aubry, M. ; Batisson, I. et Bouchard, P. The *tspo* gene, a biomarker of pesticides stress in the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* (strain SG-1).

Liste des abréviations

ACBD3 : *Acyl-CoA Binding Domain 3*
ACP : Analyse en Composante Principale
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNr : Acide Désoxyribonucléique ribosomal
Afssa : Agence française de la sécurité sanitaire des aliments
Afsse : Agence française de la sécurité sanitaire environnementale
AG : Acide Gras
ANOVA : Analyse de la Variance
ANT : *Adenine Nucleotide Transporter*
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATAD3A : *ATPase Domain family AAA*
AtTSPO : Protéine TSPO de *Arabidopsis thaliana*
CBR : *Central Benzodiazepine Receptor*
CE : Concentration Efficace
CL₅₀ : Concentration Létale 50%
COV : Composés Organiques Volatils
CSVD : Canaux Sodiques Voltage Dépendant
Da : Dalton
DDT : Dichlorodiphényltrichoroéthane
DE : Dose Efficace
DIMS : *Direct Injection Mass Spectrometry*
DL₅₀ : Dose Létale 50%
EEA : *European Environment Agency*
EFSA : *European Food Safety Authority*
EPA : *Environmental Protection Agency*
FAO : *Food and Agriculture Organization (of the United Nations)*
FAOSTAT : *Food and Agriculture Organization Statistical Database*
FRAC : *Fungicides Resistance Action Committee*
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GABA-R : Récepteur de l'acide γ -aminobutyrique
GC : *Gas Chromatography* (Chromatographie en phase Gazeuse)
HDL : *High Density Lipoprotein*
HRAC : *Herbicides Resistance Action Committee*
HS : *HeadSpace* (Espace de tête)

hTSPO : Protéine TSPO humaine
IC : Ionisation Chimique
IE : Ionisation Electronique
IMM : Membrane mitochondriale interne
IMS : Espace intermembranaire mitochondrial
IMS-MS : *Ions Mobility Spectrometry-Mass Spectrometry*
IRAC : *Insecticides Resistance Action Committee*
K : Kelvin
kDa : kilo Dalton
KEGG : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
kPa : kilo Pascal
LDL : *Low Density Lipoprotein*
LOEC : *Low Observed Effect Concentration*
LUCA : *Last Universal Common Ancestor*
MANOVA : Analyse de la Variance Multivariée
MoA : *Mode of Action*
MS : *Mass Spectrometry* (Spectrométrie de Masse)
ndi : *nutrient deprivation induced*
NGS : *Next Generation Sequencing*
NIST : *National Institute of Standards and Technology*
NMDRC : *Non-Monotonic Dose-Response Curve*
NOEC : *No Observed Effect Concentration*
OMM : Membrane mitochondriale externe
Pa : Pascal
PBR : *Peripheral Benzodiazepine Receptor*
PGPR : *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*
PKA : Protéine Kinase A
PLS : *Partial Least Square*
PPIX : Protoporphyrine IX
PTR-MS : *Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry*
QSAR : *Quantitative Structure Activity Relationship*
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SAR : *Structure Activity Relationship*
SIFT-MS : *Selected Ion Flow Tube-Mass Spectrometry*

SPME : *Solid-Phase Micro-Extraction* (Micro-Extraction en phase solide)

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory protein*

Syndrome CS : Syndrome de Choréoathetose et Salivation

Syndrome T : Syndrome de Tremblement

TM : Domaine transmembranaire

TspO : *Tryptophan-rich sensory protein O*

TSPO : *TranSlocator PrOtein*

USA : *United States of America*

VDAC : *Voltage-Dependant Anion Channel*

WHO : *World Health Organization*

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

Sommaire

REMERCIEMENTS -----	1
RESUME ETENDU -----	7
EXTENDED ABSTRACT -----	13
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES -----	19
LISTE DES ABREVIATIONS -----	25
SOMMAIRE -----	31
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES -----	37
INTRODUCTION GENERALE -----	41
CHAPITRE N°1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE -----	47
I. PESTICIDES ET ENVIRONNEMENT -----	49
A. Les pesticides -----	49
1. Définition et grands groupes de pesticides -----	49
a. Un terme, plusieurs définitions ? -----	49
b. La notion d'organisme nuisible -----	50
c. Un point règlementaire, l'enregistrement des pesticides -----	50
d. Avantages et inconvénients de l'usage des pesticides -----	51
2. Une petite histoire des pesticides -----	52
B. Utilisation et mode d'action des pesticides -----	54
1. Les grandes familles d'insecticides : utilisation et mode d'action -----	55
2. Les grandes familles d'herbicides : utilisation et mode d'action -----	56
3. Les grandes familles de fongicides : utilisation et mode d'action -----	57
C. Les pesticides dans l'environnement -----	58
1. Le devenir des pesticides dans la biosphère -----	58
a. Déplacement dans la biosphère -----	58
b. Dégradation des pesticides -----	60
2. Etat de la contamination des sols et des eaux -----	61
D. Phénylpyrazoles et pyréthri-noïdes, un focus sur deux familles d'insecticides neurotoxiques -----	62
1. Cas du fipronil, un membre des phénylpyrazoles -----	62
a. Histoire et toxicité -----	62
b. Mode d'action -----	63
c. Dégradation du fipronil -----	64
2. La famille des pyréthri-noïdes -----	65
a. Histoire des pyréthri-noïdes -----	65
b. Classification des pyréthri-noïdes -----	67
c. Toxicité des pyréthri-noïdes -----	68
d. Mode d'action des pyréthri-noïdes -----	69
e. Dégradation des pyréthri-noïdes -----	71
II. LES AUXILIAIRES DES ECOSYSTEMES, INDICATEURS DE L'IMPACT DES PESTICIDES -----	71
A. Les auxiliaires des écosystèmes -----	72
B. Cas d'un pollinisateur, l'abeille mellifère <i>Apis mellifera</i> -----	72
1. <i>A. mellifera</i> , un auxiliaire des écosystèmes sous pression ? -----	72
a. La pollinisation, un service écosystémique essentiel -----	72

b. Le déclin des populations d'abeilles mellifères -----	73
i. Facteurs biotiques -----	73
ii. Facteurs abiotiques -----	74
2. Exposition des abeilles aux pesticides -----	75
3. Effet du fipronil sur <i>A. mellifera</i> -----	77
a. Effet aigu du fipronil sur la survie -----	77
b. Effets chroniques du fipronil -----	77
C. Les bactéries du sol et <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	79
1. Les bactéries du sol, des auxiliaires des écosystèmes ? -----	79
a. L'habitat sol -----	79
b. Bactéries du sol, des auxiliaires des écosystèmes ? -----	80
c. Focus sur <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	82
2. Impact des pesticides sur les bactéries du sol -----	83
III. COMMENT EVALUER L'IMPACT DES COMPOSES TOXIQUES SUR LES ORGANISMES ? -----	84
A. La toxicologie de l'environnement et l'écotoxicologie -----	85
1. Introduction -----	85
a. Définitions -----	85
b. Notions de dose et de concentration -----	86
c. Les concepts aigu et chronique -----	86
d. Les notions de bioaccessibilité et de biodisponibilité -----	87
e. La notion de persistance -----	88
2. Courbe dose-réponse et descripteurs classiques -----	89
3. La modélisation en (éco)toxicologie -----	91
a. Toxicocinétique -----	91
b. Toxicodynamique -----	92
c. Les modèles SAR et QSAR -----	93
4. Le XXI ^{ème} siècle, un tournant dans l'étude des composés toxiques -----	93
a. Les courbes dose-réponse non-monotones et la notion de faible dose -----	94
b. La multi-exposition et la notion d'interaction -----	95
c. Effet et stress -----	97
B. (Eco)toxicogénomique et approche biomarqueur -----	98
1. Les sciences omiques et la (l'éco)toxicologie -----	98
a. De la (l'éco)toxicologie à la (l'éco)toxicogénomique -----	98
b. Sciences « omiques » et méthodes d'analyse -----	98
i. La génomique -----	99
ii. La transcriptomique -----	99
iii. La protéomique -----	100
iv. La métabolomique -----	100
2. La notion de biomarqueur -----	101
a. Introduction -----	101
b. Les différents types de biomarqueurs -----	102
i. Biomarqueurs d'exposition -----	102
ii. Biomarqueurs d'effet -----	102
iii. Biomarqueurs de susceptibilité -----	103
IV. FOCUS SUR UNE NOUVELLE APPROCHE OMIQUE EN TOXICOLOGIE : LA VOLATOLOGIQUE -----	103
A. Les Composés Organiques Volatils -----	104

1. Définition et propriétés -----	104
2. Sources d'émission des COV -----	104
3. Grands groupes moléculaires de COV biogéniques d'origine métabolique -----	105
B. Volatolome et volatolomique -----	107
1. Définition -----	107
2. Contexte méthodologique -----	107
a. Différentes méthodologies :-----	108
b. L'approche classique : HS-SPME-GC-MS -----	109
i. L'étape d'échantillonnage : HS-SPME -----	109
ii. L'étape d'analyse : la GC-MS -----	111
iii. Analyse des données -----	112
3. La volatolomique et l'étude du vivant -----	113
a. La qualité et la sécurité alimentaire -----	113
b. Le diagnostic pathologique -----	113
c. La chimiotaxonomie -----	114
d. L'écotoxicologie -----	114
C. Les COV, médiateurs des interactions du vivant -----	115
1. Les interactions intra-règne -----	115
a. Chez les microorganismes -----	115
i. Chez les bactéries -----	115
ii. Chez les champignons -----	116
b. Chez les insectes -----	116
i. Pheromones -----	117
ii. Allomones -----	117
iii. Kairomones -----	117
c. Chez les plantes -----	118
2. Les interactions inter-règne -----	118
a. Interactions bactéries-champignons -----	118
b. Interactions bactéries-protistes -----	119
c. Interactions microorganismes-plantes -----	119
d. Interactions microorganismes-insectes -----	120
e. Interactions insectes-plantes -----	120
V. LE GENE <i>TSPO</i> , FOCUS SUR UN BIOMARQUEUR POTENTIEL DU STRESS PESTICIDE -----	121
A. Découverte de TSPO et répartition dans le monde vivant -----	121
1. Dès récepteurs périphériques aux benzodiazépines à la protéine TSPO -----	121
2. La protéine TSPO dans le monde vivant -----	122
B. Structure et localisation cellulaire de la protéine TSPO -----	123
1. Chez les mammifères -----	123
2. Chez les végétaux -----	124
3. Chez les bactéries -----	125
C. La protéine TSPO, une protéine aux multiples fonctions ?-----	127
1. Chez les mammifères -----	127
2. Chez les végétaux -----	130
3. Chez les bactéries -----	131
D. Le gène <i>tspo</i> et la protéine TSPO dans le genre <i>Pseudomonas</i> -----	134

CHAPITRE N°2 LE VOLATOLOME DE L'ABEILLE DOMESTIQUE <i>APIS MELLIFERA</i> CHRONIQUEMENT EXPOSEE A DE FAIBLES DOSES DE FIPRONIL -----	137
I. INTRODUCTION -----	139
II. ARTICLE -----	141
III. RESULTATS MARQUANTS, DISCUSSION ET CONCLUSIONS -----	142
CHAPITRE N°3 EFFET BENEFIQUE POTENTIEL DE DEUX COV, MODULATEURS DES GABA-R, CHEZ <i>APIS MELLIFERA</i> CHRONIQUEMENT EXPOSEE AU FIPRONIL -----	165
I. INTRODUCTION -----	167
II. ARTICLE -----	170
III. RESULTATS MARQUANTS, DISCUSSION ET CONCLUSIONS -----	198
CHAPITRE N°4 LE GENE <i>TSPO</i> : UN BIOMARQUEUR POTENTIEL DU STRESS PESTICIDE CHEZ <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> ?-----	201
I. INTRODUCTION -----	203
II. ARTICLE -----	205
III. RESULTATS MARQUANTS, DISCUSSION ET CONCLUSIONS -----	206
CHAPITRE N° 5 DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES---	227
I. LA VOLATOLOMIQUE, UNE APPROCHE PERTINENTE EN TOXICOGENOMIQUE ?-----	229
A. La volatolomique et la mise en évidence de biomarqueurs potentiels -----	229
B. Les « limites » de la volatolomique ... en (éco)toxicologie -----	231
II. VALORISATION DE POTENTIELS BIOMARQUEURS VOLATILS ISSUS D'UNE ETUDE TOXICOGENOMIQUE -----	233
A. Bilan sur l'effet bénéfique potentiel du 1-octen-3-ol sur la survie de l'abeille -----	233
B. Les limites des descripteurs moléculaires analysés par qPCR -----	234
C. D'autres pistes de valorisation pour les COV neurotropes -----	235
III. LE GENE <i>TSPO</i> : UN MARQUEUR GENIQUE DU STRESS PYRETHRINOÏDE CHEZ <i>P.</i> <i>FLUORESCENS</i> ? -----	236
A. Les prémices de la sélection du marqueur <i>tspo</i> ... vers un changement d'organisme modèle -----	236
B. La CE10 chez <i>P. fluorescens</i> , quelques limites : -----	237
C. Bilan sur l'expression du gène <i>tspo</i> chez <i>P. fluorescens</i> exposé à différents pesticides : -----	238
D. Les limites de l'approche ddPCR : -----	239
E. Des perspectives pour l'étude du gène <i>tspo</i> : -----	240
CHAPITRE N°6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	241
ANNEXE N°1 LES INSECTICIDES ET LEURS MODES D'ACTION-----	267
ANNEXE N°2 LES HERBICIDES ET LEURS MODES D'ACTION -----	273
ANNEXE N°3 LES FONGICIDES ET LEURS MODES D'ACTION -----	279

*Liste des figures et des
tables*

Figure 1. Evolution de la population humaine mondiale de 1950 à 2021	53
Figure 2. Utilisation agricole des pesticides dans le monde	55
Figure 3. Utilisation agricole des insecticides dans le monde	56
Figure 4. Utilisation agricole des herbicides dans le monde	57
Figure 5. Utilisation agricole des fongicides et bactéricides dans le monde	58
Figure 6*. Déplacement des polluants dans la biosphère	59
Table 1. La toxicité du fipronil pour quelques exemples d'organismes	62
Figure 7*. Représentation schématique du mode d'action du fipronil	63
Figure 8. Représentation schématique de la dégradation du fipronil	65
Figure 9. Structure chimique des composants du pyrèthre	66
Figure 10. Exemples de pyréthrinoïdes de type I et de type II	68
Table 2. La toxicité des pyréthrinoïdes pour quelques groupes d'organismes	68
Figure 11*. Mode d'action des pyréthrinoïdes sur le système nerveux	70
Figure 12*. Principaux facteurs biotiques et abiotiques participants au déclin des populations d'abeilles domestiques	73
Figure 13. Principales voies d'exposition de <i>A. mellifera</i> aux pesticides	75
Figure 14. Pesticides retrouvés dans trois produits de la ruche	76
Figure 15*. Bilan des principaux effet aigus et chroniques du fipronil chez <i>A. mellifera</i>	77
Figure 16. Représentation synthétique de la structure du sol	79
Figure 17*. Réseau trophique simplifié représentant les quatre grandes étapes des cycles biogéochimiques	81
Figure 18*. Schéma bilan des interactions entre les bactéries de la rhizosphère (PGPR) et les végétaux	82
Figure 19*. Bilan de l'impact des pesticides sur les communautés bactériennes du sol	83
Figure 20*. Schéma récapitulatif de la distinction entre les domaines de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie	86
Figure 21*. Courbe dose-réponse monotone et descripteurs classiques en (éco)toxicologie	90
Figure 22*. Schéma bilan des approches toxicocinétique et toxicodynamique	92
Figure 23. Exemples de courbes dose-réponse non-monotones	95
Figure 24*. Schéma bilan sur la notion d'interaction	96
Figure 25*. Sciences « omiques » et méthodes d'analyse	99

Table 3. Les principales grandes familles de COV	105
Figure 26. Représentation schématique des principales voies métaboliques conduisant à la production de COV	106
Figure 27* . Le <i>workflow</i> volatolomique	108
Figure 28* . Représentation schématique de l'espace de tête et des constituants d'un dispositif SPME	109
Figure 29. Processus d'extraction des COV par la méthode HS-SPME	110
Figure 30. Exemple détaillé d'un couplage entre un chromatographe en phase gazeuse et un spectromètre de masse	111
Figure 31. Arbre phylogénétique des protéines TSPO dans les trois domaines du vivant	122
Figure 32. Représentation de la structure en trois dimensions du monomère TSPO	124
Figure 33. Profils d'hydrophobicité de séquences protéiques de la famille TSPO	125
Figure 34. Représentation de la structure en trois dimensions du dimère TSPO de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	126
Table 4. Les principaux processus associés aux protéines TSPO chez les mammifères	127
Figure 35* . Schéma simplifié de la stéroïdogénèse	128
Figure 36. Représentation schématique des protéines formant le transducesome et le métabolon	130
Figure 37* . Le rôle de la protéine TSPO chez <i>R. sphaeroides</i>	132
Figure 38* . Schéma synthétique de la biodégradation de la protoporphyrine IX	133
Figure 39. Rôles des protéines TSPO dans la réponse au stress chez divers organismes	135

* Figure réalisée à l'aide de l'outil bioRENDER

Introduction générale

Les ressources naturelles (eau, terres fertiles, biodiversité) sont à la base de l'économie et de la qualité de la vie et doivent être préservées (notamment vis-à-vis des risques chimiques). Concernant l'usage et l'effet des produits phytosanitaires, une prise de conscience s'opère depuis la fin des années 1960, avec la mise en exergue des risques potentiels (parfois avérés) de ces substances sur l'environnement (biodiversité, services écosystémiques) et sur la santé humaine (lien avec certaines pathologies chroniques, cancers, empoisonnements). Cette prise de conscience a conduit à la création d'agence de régulation (EPA en 1970 aux Etats-Unis et l'EEA en Europe en 1994) promulguant des directives sur les conditions de mise et de maintien sur le marché des produits phytosanitaires (les fabricants doivent mettre en œuvre des tests permettant de prouver que les pesticides proposés n'ont pas d'effet majeur sur la santé humaine, sur l'environnement et évaluer la présence de résidus dans les chaînes de production alimentaire). L'évaluation du risque écologique de ces polluants est donc devenue une nécessité afin de mesurer leur impact sur l'Homme et les écosystèmes. Aujourd'hui, ce sont des approches de chimie analytique qui sont mises en place par les agences de sécurité sanitaire pour répondre à cet objectif. Ces méthodes fournissent un aperçu de l'état de contamination des milieux en détectant et de quantifiant la présence de résidus de pesticides (ou de certains de leurs produits de dégradation) dans les différentes matrices de l'environnement (sol, air, eau), mais elles ne permettent pas d'estimer les impacts biologiques sur les organismes peuplant ces écosystèmes. Une méta-analyse publiée par Schulz et collaborateurs (Schulz *et al.*, 2021) a soulevé le débat de l'impact des produits phytosanitaires sur les organismes non-cibles. Cette étude, basée sur l'utilisation de près de 400 pesticides sur une période de 25 ans, montre que la toxicité des insecticides sur les arthropodes (terrestres et aquatiques) et sur les pollinisateurs n'a fait qu'augmenter depuis le début des années 1990 malgré l'utilisation de beaucoup plus faibles doses. Ceci est essentiellement lié à la mise sur le marché et à l'utilisation massive de deux familles d'insecticides systémiques : les pyréthrianoïdes et les néonicotinoïdes. Les résultats proposés vont donc à l'encontre des affirmations quant à la diminution des impacts environnementaux des produits phytosanitaires.

Le développement d'outils et d'approches méthodologiques pour l'aide à la prise de décision (par les autorités de régulation) dans l'optique de conduire à une utilisation raisonnée de ces produits phytosanitaires est essentiel. Pour cela, il est nécessaire de recourir à des approches pluridisciplinaires associant les sciences du vivant, la chimie, la physique, la géologie, les mathématiques et les sciences numériques. Ce sont les enjeux de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie qui visent à déterminer le devenir de ces substances dans l'environnement, de comprendre les interactions entre xénobiotique et organisme

(notamment à l'échelle moléculaire), d'évaluer les effets de ces interactions (de la cellule à l'écosystème) et de mettre en évidence de potentiels marqueurs de l'exposition ou de l'effet de ces substances sur les organismes dans l'objectif d'évaluer et de prédire les risques liés à leur utilisation (que ce soit chez l'Homme ou chez des organismes non-cibles).

Les approches de toxicologie et d'écotoxicologie dites « classiques » ne s'intéressent qu'à un nombre réduit de descripteurs (que ce soit des gènes, des protéines ou des métabolites par exemple) (Hamadeh *et al.*, 2002). Cependant, déterminer les mécanismes biologiques globaux permettant de répondre à une perturbation est une clé pour étudier la réponse d'un organisme soumis à un stress donné (Hayward, 2014). Pour cela, les approches « omiques » (développées depuis les années 1990), ciblant des modifications du transcriptome, du protéome ou du métabolome complet d'un organisme peuvent permettre la mise en évidence de signatures (biomarqueurs) témoignant de l'exposition ou de l'effet d'un xénobiotique sur un organisme (Galloway *et al.*, 2004; Ankley *et al.*, 2006). Ces techniques dites « haut débit » permettent d'avoir accès à une vue globale de la réponse de l'organisme, et définissent une nouvelle branche de la toxicologie, dite « toxicogénomique ». Avec ce type d'approche, on ne s'intéresse plus seulement au contaminant en lui-même mais aux conséquences qu'il peut laisser dans les systèmes biologiques (modification du transcriptome ou du métabolome par exemple). L'objectif n'est donc plus seulement de quantifier des résidus de pesticides mais de mesurer l'exposition des différents maillons d'un réseau trophique. Dans un contexte plus large, l'écotoxicogénomique (début des années 2000) est définie comme utilisant une ou des approches « omiques » appliquées sur plusieurs organismes modèles, issus de l'environnement, et dans les cas favorables représentatifs d'un écosystème perturbé. Ainsi, plutôt que de déterminer si un composé chimique est toxique, la toxicogénomique et l'écotoxicogénomique proposent de déterminer comment un composé chimique est toxique en étudiant le comportement de milliers de descripteurs en réponse à une exposition.

Mes travaux de thèse avaient pour objectifs principaux de : (i) Confirmer la pertinence de l'utilisation de l'approche volatolomiques (approche haut-débit ciblant les composés organiques volatiles) dans un contexte de toxicologie environnementale ; (ii) Mettre en évidence de potentiels biomarqueurs volatiles (signature) témoignant d'une exposition au fipronil chez l'abeille *Apis mellifera* ; (iii) Valoriser les composés issus de la signature volatile obtenue chez l'abeille ; et (iv) Déterminer le potentiel d'un biomarqueur génique, le gène *tspo*, comme marqueur spécifique d'une exposition aux insecticides pyréthrinoides chez la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.

Ce manuscrit de thèse se divise en six chapitres :

- **Chapitre n°1** : une synthèse bibliographique (en cinq parties) faisant un état des connaissances sur : les pesticides en se focalisant sur deux groupes d'insecticides neurotoxiques, les pyréthriinoïdes et les phénylpyrazoles ; les auxiliaires des écosystèmes au travers de deux exemples, *Apis mellifera* et *Pseudomonas fluorescens* ; la toxicologie environnementale et l'écotoxicologie, ainsi que leurs limites et évolutions ; les composés organiques volatiles et l'approche volatolomique ; le gène et la protéine TSPO dans le vivant
- **Chapitre n°2** : une première étude portant sur les effets d'une exposition chronique à de faibles doses de fipronil sur le volatolome de l'abeille mellifère *Apis mellifera* ;
- **Chapitre n°3** : une seconde étude portant sur le potentiel effet bénéfique de deux composés organiques volatils (1-octen-3-ol et 2,6-diméthylcyclohexanol, provenant du volatolome de l'abeille) modulateurs des récepteurs GABA, dans le cas d'une exposition chronique à de faibles doses de fipronil chez l'abeille *A. mellifera* ;
- **Chapitre n°4** : une troisième étude portant sur le potentiel du gène *tspo*, comme marqueur de l'exposition aux insecticides pyréthriinoïdes chez la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens* ;
- **Chapitre n°5** : les conclusions, discussion générale et perspectives de mes travaux de thèse ;
- **Chapitres n°6** : les références bibliographiques utilisées dans ce manuscrit.

Les chapitres 2 à 4 sont présentés sous la forme d'articles scientifiques en langue anglaise (publiés ou en préparation), précédé d'une section rédigée en français (appelée introduction) précisant le contexte de l'étude, la (ou les) hypothèse(s) de départ, les objectifs de l'étude. Sera ensuite proposé l'article scientifique en lui-même suivi d'une seconde section rédigée en français intitulée : résultats marquants, discussion et conclusion.

*Chapitre n°1 Introduction
bibliographique*

I. Pesticides et environnement :

Dès les prémices de l'agriculture, au Néolithique, la protection des cultures était déjà au centre des préoccupations des agriculteurs. Aujourd'hui, cette problématique est toujours présente dans un contexte où la population humaine est en constante augmentation, nécessitant des modifications profondes des pratiques agricoles. Cela a conduit à l'apparition de l'agriculture intensive (aujourd'hui nommée agriculture conventionnelle). Ces pratiques sont fortement liées à la mécanisation, à l'optimisation des espèces végétales et à l'utilisation des intrants chimiques (Pimentel, 1996; Sánchez-Bayo, 2011b; Lamberth *et al.*, 2013).

A. Les pesticides :

1. Définition et grands groupes de pesticides :

a. Un terme, plusieurs définitions ?

Le terme « pesticide » est un mot anglais dérivé du latin qui peut être décomposé en un préfixe *pest-*, qui signifie nuisible, et un suffixe *-cide*, qui signifie tuer. Pour discuter cette notion, on peut essayer de la définir en se basant sur trois définitions proposées par des agences réglementaires nationales et internationales :

- « Substances actives ou préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries » (Autorité Européenne de la Sécurité des Aliments, EFSA)
- « Toute substance ou mélange de substances à base d'ingrédients chimiques ou biologiques destinés à repousser, détruire ou contrôler tout organisme nuisible, ou à réguler la croissance des plantes » (Organisation de l'Agriculture et de l'Alimentation américaine, FAO ; Agence de Protection de l'Environnement américaine, EPA)
- « Produits chimiques utilisés pour tuer les organismes nuisibles, incluant les insectes, les rongeurs, les champignons et les mauvaises herbes » (Organisation Mondiale de la Santé, WHO).

Ces trois définitions sont proches car elles indiquent la volonté de lutter contre des organismes nuisibles mais présentent chacune leur spécificité. Il n'y a donc pas une définition

fixe à l'échelle internationale. Une composante manquante dans ces définitions est la notion de libération intentionnelle (Sánchez-Bayo, 2011b; Casida, 2017) qui est pourtant une constante dans l'utilisation de ces produits. La définition pourrait être améliorée comme suit : « Ce sont des composés chimiques, d'origine naturelle ou synthétique, intentionnellement libérés dans l'environnement dans le but de repousser, de détruire ou de contrôler des populations d'organismes jugés nuisibles ».

Désormais, à l'échelle européenne, le terme pesticide est devenu une notion générale qui se décline en trois axes selon l'utilisation prévue : des composés phytopharmaceutiques (ou phytosanitaires) dédiés à l'usage agricole, des médicaments utilisés en médecine humaine ou vétérinaire et des biocides pour les autres applications (urbanisme, usage domestique, ...). Dans ce manuscrit, le terme pesticide est essentiellement associé à l'axe phytopharmaceutique.

b. La notion d'organisme nuisible :

Les animaux, végétaux et microorganismes peuplant les écosystèmes ne présentent, la plupart du temps, aucun danger ou aucune gêne pour les populations humaines. Cette biodiversité est même essentielle à leur survie (Casida, 2009). En revanche, si un organisme vient à impacter les activités humaines que ce soit de manière directe (pathologie) ou indirecte (impact sur l'agriculture) alors il est considéré comme nuisible ou indésirable. Dans une optique de performance et d'optimisation des pratiques agricoles conventionnelles, des stratégies de lutte sous formes de traitements pesticides, vont alors être développées ou mises en place pour réguler ces organismes nuisibles (Casida, 2009; Sánchez-Bayo, 2011b).

On estime à 67 000 le nombre d'espèces d'organismes nuisibles avec environ 50 000 espèces de microorganismes, 9000 espèces d'insectes et 8000 espèces de végétaux. Seules 5 à 10% de ces espèces sont jugées comme des nuisibles d'importance ayant un impact significatif que ce soit sur la santé ou sur l'agriculture (Pimentel, 2009; Pimentel and Burgess, 2014a).

c. Un point réglementaire, l'enregistrement des pesticides :

L'enregistrement d'un pesticide est un processus administratif basé sur des données scientifiques. C'est une partie intégrante du management des pesticides qui définit si un pesticide peut ou non être utilisé (mode d'action, impact sur les organismes non-cibles, cycle de vie du produit) et dans quelles conditions (Damalas and Eleftherohorinos, 2011). Ce processus très long et coûteux (10 à 12 ans de développement en moyenne) a entraîné un

ralentissement du développement de nouvelles molécules et une réduction du nombre d'industries dans ce secteur (Casida and Quistad, 1998; Damalas and Eleftherohorinos, 2011).

A la fin de la première moitié du XX^{ème} siècle, les pesticides de synthèse ont commencé à être produits massivement, étant fréquemment considérés comme des composés sans dangers. Les effets néfastes observés (mort d'organismes non-cibles notamment) sont alors considérés comme des effets secondaires normaux et acceptables. La création et la commercialisation rapide de nouvelles molécules de synthèse ont alors été encouragées dans les années 1940-1950. Dans ce contexte, les tests toxicologiques étaient peu nombreux et se limitaient en général à des tests de toxicité aiguë (par voie trophique ou topique) avec une forte dose de produit sur un nombre très limité d'espèces. L'enregistrement des pesticides était donc plutôt simple. A la fin des années 1950, les mentalités ont commencé à changer du fait des effets néfastes visibles et majeurs que pouvaient avoir les pesticides sur la santé humaine et sur l'environnement. De nombreux lanceurs d'alerte, notamment aux USA, activent un changement de paradigme. Ces changements de mentalité ont conduit à la création de processus d'enregistrement plus complexes et à la création d'agences de régulation comme l'EPA en 1970 (Casida and Quistad, 1998).

Les agences d'enregistrement ont également pour rôle de poursuivre les études sur les produits déjà commercialisés, on parle alors de réenregistrement. Dans la vie d'un produit, cette étape correspond à l'actualisation des données disponibles avec la mise en place de tests réglementaires complémentaires à ceux réalisés pendant l'étape d'enregistrement. L'étape de réenregistrement peut conduire soit au maintien du produit sur le marché, soit à son retrait (Damalas and Eleftherohorinos, 2011).

d. Avantages et inconvénients de l'usage des pesticides :

Les pesticides présentent des avantages certains, ils permettent de protéger les cultures des organismes nuisibles et donc d'améliorer les rendements et la disponibilité nutritionnelle pour l'Homme et les animaux d'élevage (Oerke and Dehne, 2004; Aktar *et al.*, 2009). Ils permettent également de préserver l'Homme et les animaux d'un certain nombre de pathologies vectorisées par les insectes et d'entretenir les biens privés et publics (Aktar *et al.*, 2009).

Cependant, les inconvénients liés à l'usage des pesticides sont majeurs : impact sur la santé humaine avec de nombreux cas d'empoisonnement et le développement de diverses pathologies chroniques, contamination généralisée des différents compartiments des écosystèmes (sol, eau de surface, eau souterraine, atmosphère, composante biotique) et impacts

sur les organismes non-cibles de ces produits (Pimentel *et al.*, 1993; Pimentel, 1996; Casida and Quistad, 1998; DeLorenzo *et al.*, 2001; Oerke and Dehne, 2004; Desneux *et al.*, 2007; Aktar *et al.*, 2009; Schafer *et al.*, 2011; Damalas and Eleftherohorinos, 2011; Sánchez-Bayo, 2011b; Larsen and Noack, 2017).

Un pesticide idéal serait donc un composé ne ciblant que les organismes nuisibles que l'on cherche à réguler. Ce n'est pas le cas des pesticides utilisés actuellement, qui sont des composés généralistes ayant un spectre toxique large affectant de nombreux organismes non-cibles (Aktar *et al.*, 2009; Casida, 2009).

2. Une petite histoire des pesticides :

L'histoire des pesticides trouve ses sources historiques dès l'Antiquité avec l'utilisation des sels métalliques ou du pyrèthre de Dalmatie en Perse (Casida and Quistad, 1998; Pimentel, 2009). L'âge d'or des pesticides n'a cependant débuté qu'à la fin de la Seconde Guerre Mondiale. Avant cette période, l'usage des produits chimiques en agriculture était très limité (arsenic, nicotine, pyrèthre), les agriculteurs utilisaient d'autres méthodes (travail du sol, rotation des cultures) pour lutter contre les organismes indésirables (Casida and Quistad, 1998; Sánchez-Bayo, 2011b; Pimentel and Burgess, 2014a, 2014b; Casida and Durkin, 2017).

Le monde a radicalement changé à la fin de la seconde guerre mondiale avec une croissance démographique jusqu'alors sans précédent. La population mondiale n'a fait qu'augmenter (et augmente toujours actuellement) (**Figure 1**) et est associée à une modification de la ration alimentaire qui devient plus riche en protéines animales ce qui entraîne indirectement une augmentation de la population mondiale de bétail et des surfaces dédiées à son alimentation (Oerke and Dehne, 2004; Aktar *et al.*, 2009; Lamberth *et al.*, 2013; Landis *et al.*, 2014; Larsen and Noack, 2017). Nourrir tous ces organismes est un défi conséquent pour l'agriculture moderne qui se tourne alors vers l'intensification et l'usage massif des intrants chimiques. La ruée vers l'or des pesticides a débuté en 1943 avec la mise sur le marché du dichlorodiphényltrichoroéthane ou DDT (découvert en 1874 par Zeidler, puis par Müller en 1939), suivie par celle de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D (découvert par Templeman et Sexton en 1941) et de la dieldrine (découverte en 1948 par Hyman). S'en est suivie une période d'insouciance où les pesticides ont été développés et utilisés en grande quantité sans se soucier des effets que pouvaient avoir ces derniers (Casida and Quistad, 1998; Pimentel, 2009; Pimentel and Burgess, 2014a; Casida and Durkin, 2017).

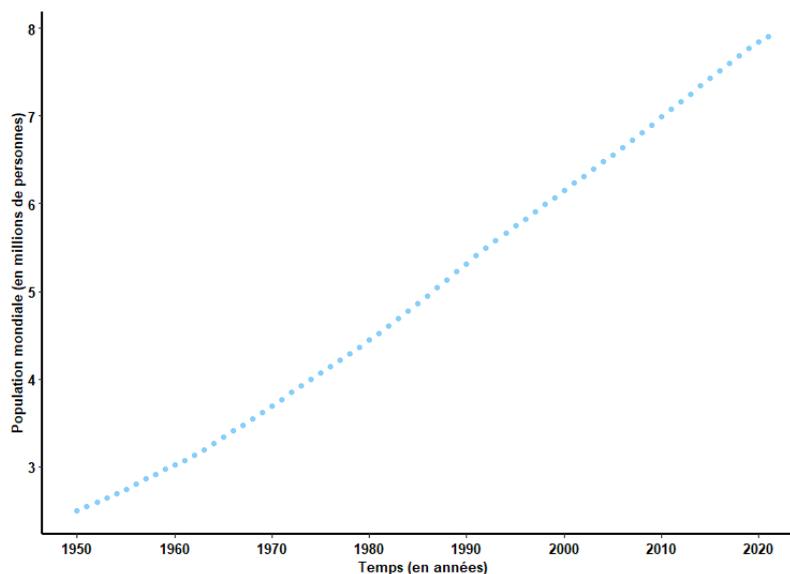


Figure 1. Evolution de la population humaine mondiale de 1950 à 2021, d'après les données de la FAO (<https://www.fao.org/faostat/en/#home>).

Cette période n'a duré qu'une vingtaine d'années, les effets sur l'environnement (publication de l'ouvrage *Silent spring*) et la santé (des traces de pesticides ont été mises en évidence dans les matrices alimentaires végétales et animales, mise en lien avec certaines pathologies chroniques ou des cancers) de certains de ces produits ayant commencé à alerter l'opinion publique et les autorités (Carson, 1962; Pimentel, 1996; Casida and Quistad, 1998; Aktar *et al.*, 2009; Damalas and Eleftherohorinos, 2011; Sánchez-Bayo, 2011b). De nombreux composés jugés trop dangereux ont alors été bannis (nombreux pesticides organochlorés) dans les pays industrialisés à la fin des années 1970 jusqu'au début des années 1980. L'industrie agrochimique a alors changé ses méthodes pour développer de nouveaux composés moins persistants dans l'environnement et plus spécifiques des organismes cibles ce qui a notamment conduit à l'apparition des pesticides organophosphorés, des carbamates et des pyréthriinoïdes (Casida and Quistad, 1998; Casida, 2009; Palmquist *et al.*, 2012; Casida and Durkin, 2017). En parallèle de cette prise de conscience, l'émergence du phénomène de résistance chez les organismes cibles (deux ans après sa première utilisation, des mouches résistantes au DDT ont été découvertes dans l'état de New-York) aux pesticides a soulevé la question de la pérennisation de ces pratiques agricoles basées sur l'usage de ces molécules (Casida and Quistad, 1998; Casida, 2009; Pimentel, 2009; Pimentel and Burgess, 2014a).

Aujourd'hui, malgré l'usage d'un véritable arsenal chimique les pertes annuelles agricoles mondiales s'élèvent à environ 40% (14% à cause des insectes, 13% à cause de phytopathogènes et 13% à cause des végétaux) (Oerke and Dehne, 2004; Pimentel, 2009;

Sánchez-Bayo, 2011b; Pimentel and Burgess, 2014b). Les modèles prédisent toutefois que leur éviction entraînerait des pertes agricoles annuelles à l'échelle mondiale de l'ordre de 70% ce qui serait associé à une augmentation de 66% de la malnutrition dans le monde (y compris dans les pays développés) (Pimentel, 2009; Pimentel and Burgess, 2014b).

Depuis une trentaine d'années, des études tendent à montrer qu'une réduction de l'usage de pesticides d'au moins 50% est cependant envisageable et n'entraînerait qu'une baisse minime des rendements (0,6%) et une hausse réduite des prix des produits alimentaires (0,3%). Des programmes visant à réduire l'usage des pesticides ont déjà été mis en place (au Danemark depuis 1985 ou en Suède depuis 1988 par exemple) et montrent une grande efficacité (Pimentel *et al.*, 1993; Pimentel, 1996, 2009; Pimentel and Burgess, 2014a, 2014b).

B. Utilisation et mode d'action des pesticides :

L'utilisation des pesticides (en agriculture) à l'échelle mondiale n'a cessé d'augmenter depuis la fin du XX^{ème} siècle (**Figure 2A**) pour atteindre plus de 3,5 millions de tonnes en 2021.

D'un point de vue géographique, les pays émergents (à l'exception des Etats-Unis) sont les principaux consommateurs de ces produits phytosanitaires (**Figure 2B**). Le Brésil (720 000 t), les Etats-Unis (460 000 t), l'Indonésie (283 000 t), la Chine (245 000 t) et l'Argentine (242 000 t) sont les cinq principaux pays consommateurs de pesticides en 2021.

Une grande diversité de pesticides est actuellement disponible sur le marché (environ 1300 produits enregistrés en 2011) (Schafer *et al.*, 2011). Ces composés peuvent être classés de différentes manières que ce soit en fonction des organismes ciblés, de leur structure chimique ou encore de leur mode d'action (Aktar *et al.*, 2009; Sánchez-Bayo, 2011b). Je propose ici, une classification des principales familles de pesticides en fonction du groupe d'organisme ciblé : algicides (micro- et macroalgues), acaricides (acariens), fongicides (champignons), herbicides (végétaux), insecticides (insectes), molluscicides (mollusques), nématicides (vers ronds), piscicides (poissons), rodenticides (rongeurs) et taupicides (taupes).

La grande majorité des pesticides vendus (69%) est représentée par trois familles : les herbicides (31% du marché), les insecticides (21% du marché) et les fongicides (17% du marché). Les 31% restant sont réparties entre les autres familles de pesticides citées précédemment (Sánchez-Bayo, 2011b). Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur l'usage et le mode d'action des pesticides les plus utilisés dans le monde : les insecticides, les herbicides et les fongicides.

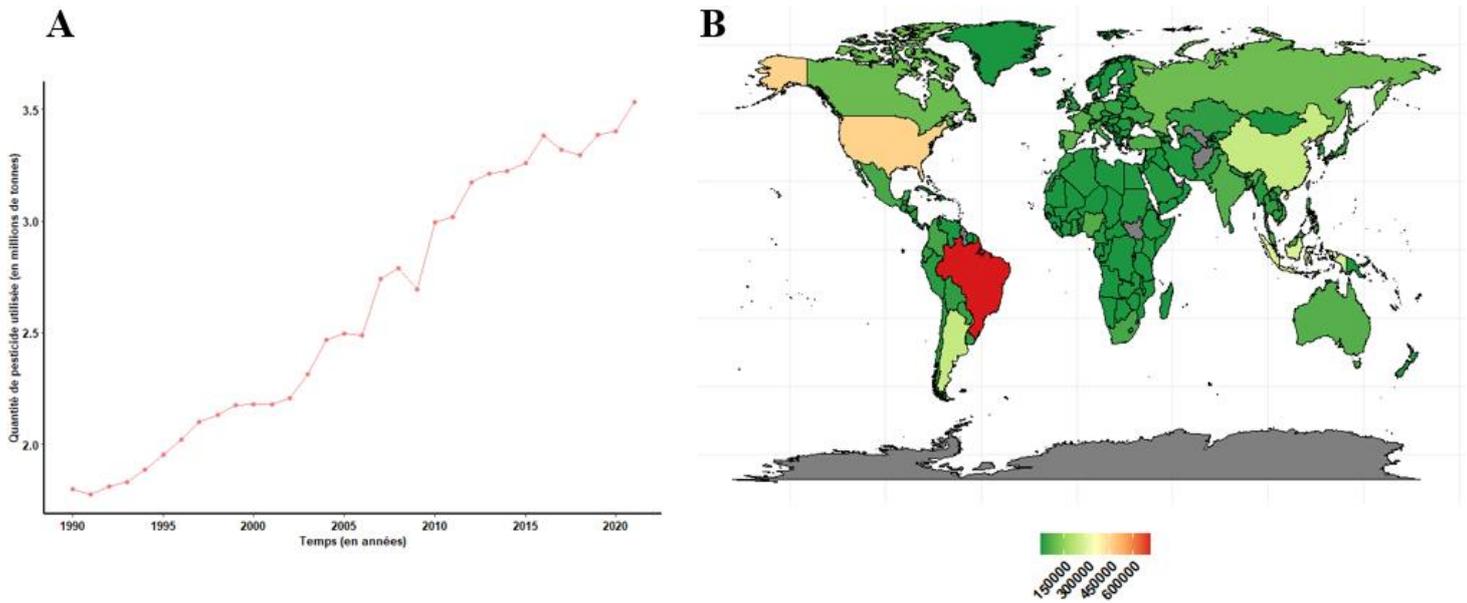


Figure 2. (A) Evolution de la quantité de pesticides (en millions tonnes) utilisée dans le monde de 1990 à 2021 en agriculture. (B) Représentation cartographique de la consommation de pesticides, à usage agricole, dans le monde en 2021. Le gradient de couleur donne les intervalles de quantité (en tonnes) associés à chaque pays. Les zones grises correspondent aux aires géographiques pour lesquelles les données sont absentes. (D’après FAOSTAT, 2021).

1. Les grandes familles d’insecticides : utilisation et mode d’action :

La dynamique mondiale de l’utilisation des insecticides en agriculture suit celle observée pour les pesticides avec une augmentation continue depuis le début des années 1990 (**Figure 3A**) et atteint environ 760 000 t en 2021. En 2021 (**Figure 3B**), les cinq pays utilisant le plus d’insecticides sont : l’Indonésie (165 000 t), le Brésil (122 000 t), les Etats-Unis (74 000 t), la Chine (66 000 t) et l’Inde (32 000 t).

En se basant sur la classification proposée par le Comité d’Action contre la Résistance aux Insecticides (*Insecticides Resistance Action Committee*, IRAC), quatre groupes d’insecticides peuvent être décrits en se basant sur leur mode d’action : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance, les inhibiteurs de la respiration et les perturbateurs des fonctions digestives (Sánchez-Bayo, 2012; IRAC MoA Working group, 2023). L’**Annexe 1** présente une vue synthétique des différents groupes d’insecticides, de leur mode d’action ainsi que des exemples de molécules associées.

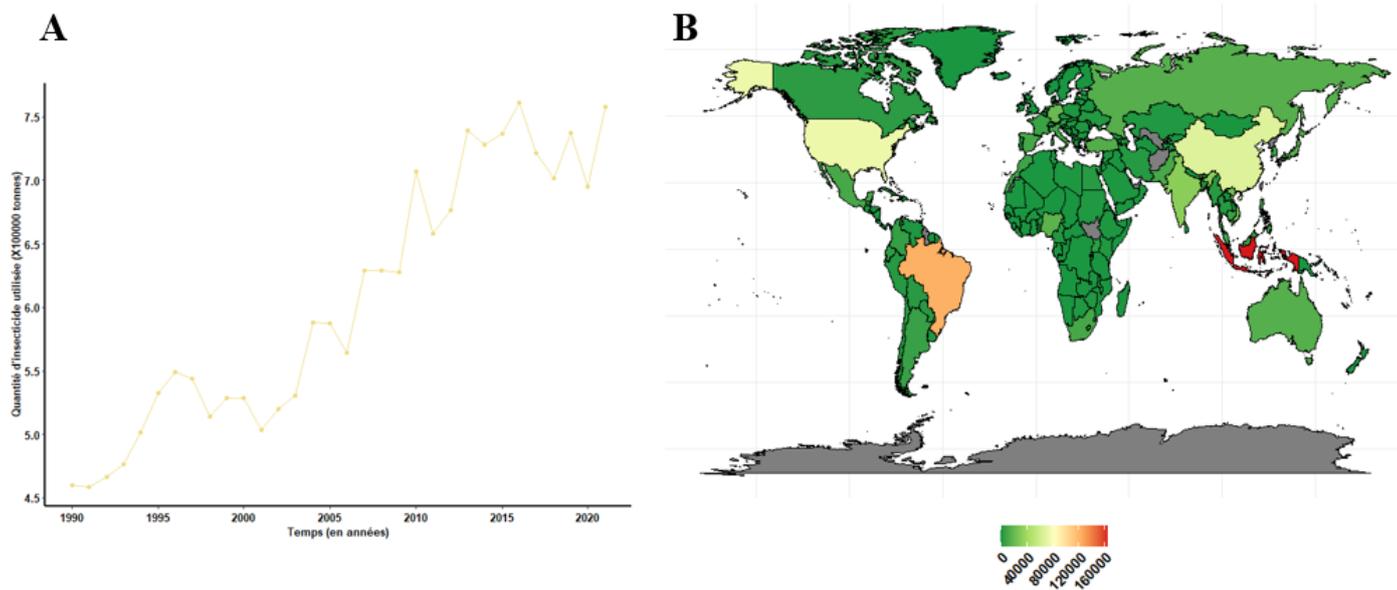


Figure 3. (A) Evolution de la quantité d’insecticides (X100 000 tonnes) utilisée dans le monde de 1990 à 2021 en agriculture. (B) Représentation cartographique de la consommation d’insecticides, à usage agricole, dans le monde en 2021. Le gradient de couleur donne les intervalles de quantité (en tonnes) associés à chaque pays. Les zones grises correspondent aux aires géographiques pour lesquelles les données sont absentes. (D’après FAOSTAT, 2021).

2. Les grandes familles d’herbicides : utilisation et mode d’action :

La dynamique mondiale de l’utilisation des herbicides en agriculture suit aussi celle observée pour les pesticides avec une augmentation continue depuis le début des années 1990 (**Figure 4A**) pour atteindre environ 1,7 millions de tonnes en 2021. En 2021 (**Figure 4B**), les cinq pays utilisant le plus d’herbicide sont : le Brésil (407 000 t), les Etats-Unis (287 000 t), l’Argentine (228 000 t), la Chine (101 000 t) et le Canada (72 000 t).

En se basant sur la classification proposée par le Comité d’Action contre la Résistance aux Herbicides (*Herbicides Resistance Action Committee*, HRAC), six groupes d’herbicides peuvent être décrits en se basant sur leur mode d’action. Nous pouvons distinguer les herbicides agissant sur : la biosynthèse des acides aminés, la biosynthèse des acides gras, la photosynthèse, la biosynthèse des pigments, la division cellulaire et la croissance (Duke and Dayan, 2011; HRAC MoA Working group, 2020). L’**Annexe 2** présente une vue synthétique des différents groupes d’herbicides, de leur mode d’action ainsi que des exemples de molécules associées.

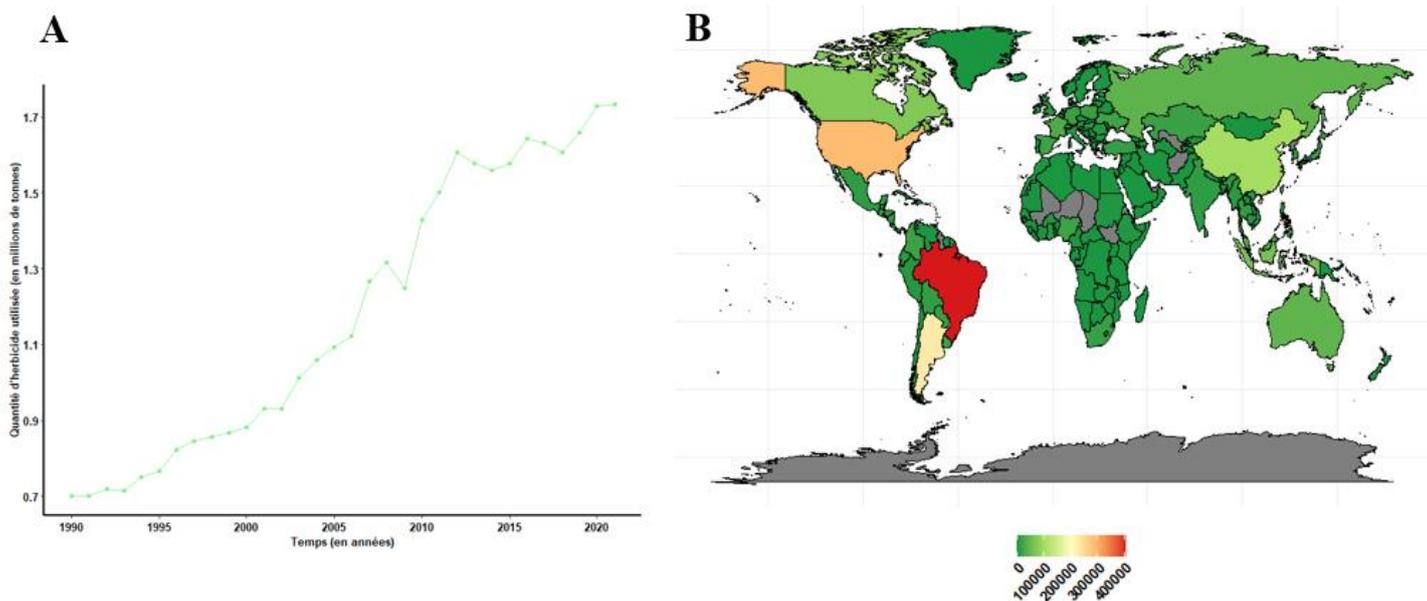


Figure 4. (A) Evolution de la quantité d’herbicides (en millions de tonnes) utilisée dans le monde de 1990 à 2021 en agriculture. (B) Représentation cartographique de la consommation d’herbicides, à usage agricole, dans le monde en 2021. Le gradient de couleur donne les intervalles de quantité (en tonnes) associés à chaque pays. Les zones grises correspondent aux aires géographiques pour lesquelles les données sont absentes. (D’après FAOSTAT, 2021).

3. Les grandes familles de fongicides : utilisation et mode d’action :

La dynamique mondiale de l’utilisation des fongicides et bactéricides à usage agricole suit également celle observée pour les pesticides en général avec une augmentation continue depuis 1990 (**Figure 5A**) pour atteindre 816 000 t en 2021. En 2021 (**Figure 5B**), les cinq principaux consommateurs de ces produits sont : le Brésil (168 000 t), la Chine (64 000 t), l’Espagne (42 000 t), l’Indonésie (40 000 t) et la Russie (36 000 t).

En se basant sur la classification proposée par le Comité d’Action contre la Résistance aux Fongicides (*Fungicides Resistance Action Committee*, FRAC), neuf groupes de fongicides peuvent être décrits en se basant sur leur mode d’action. Il est possible de distinguer les fongicides agissant sur : le métabolisme des acides nucléiques, le cytosquelette, la respiration, le métabolisme des protéines, la transduction du signal, la biosynthèse des lipides, la biosynthèse des stérols, la biosynthèse de la paroi cellulaire et la biosynthèse de la mélanine (FRAC MoA working group, 2022). L’**Annexe 3** présente une vue synthétique des différents groupes de fongicides, de leur mode d’action ainsi que des exemples de molécules associées.

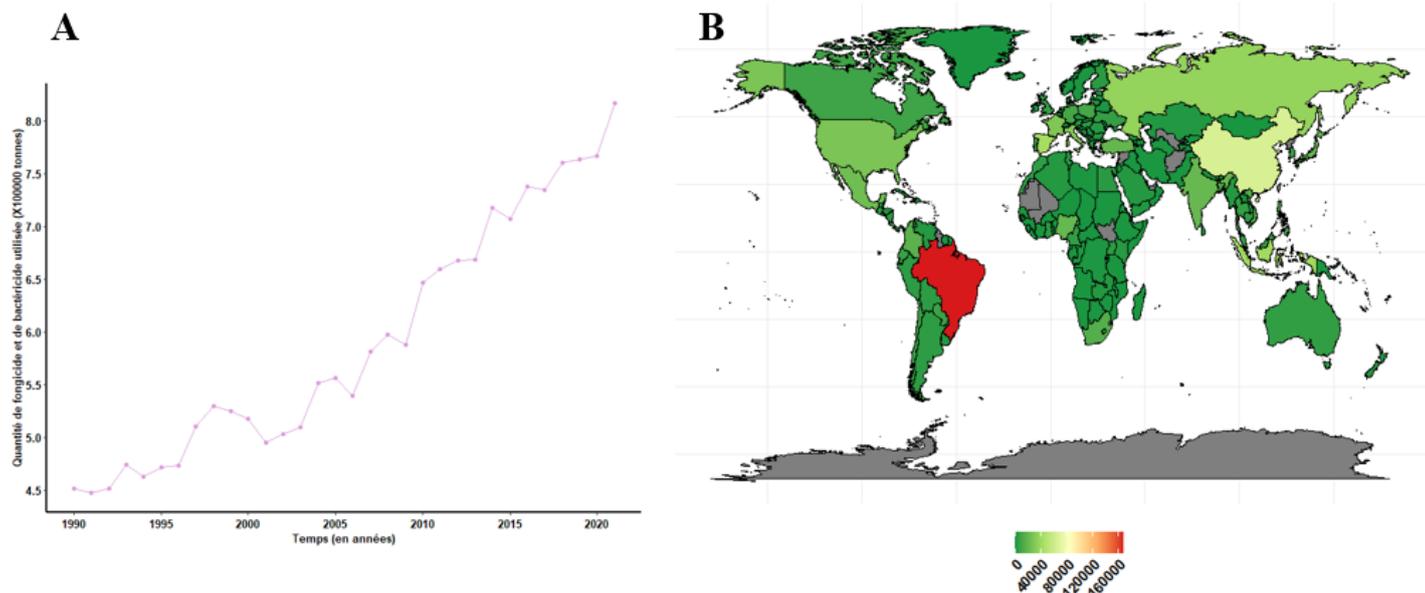


Figure 5. (A) Evolution de la quantité de fongicides et de bactéricides (X100 000 tonnes) utilisée dans le monde de 1990 à 2021 en agriculture. (B) Représentation cartographique de la consommation de fongicides et de bactéricides, à usage agricole, dans le monde en 2021. Le gradient de couleur donne les intervalles de quantité (en tonnes) associés à chaque pays. Les données mises à disposition par la FAO ne permettent pas de différencier la quantité de fongicides et de bactéricides utilisés en agriculture, les chiffres proposés ici sont la somme de la quantité de ces deux types de pesticides. (D'après FAOSTAT, 2021).

C. Les pesticides dans l'environnement :

1. Le devenir des pesticides dans la biosphère :

a. Déplacement dans la biosphère :

Les propriétés physico-chimiques associées à un pesticide gouvernent principalement son devenir dans la biosphère. La biosphère est constituée de quatre compartiments interagissant les uns avec les autres : l'atmosphère, l'hydrosphère, la pédosphère et la biomasse (Ramade, 2007b).

Lors de sa libération dans l'environnement, un pesticide peut rejoindre l'atmosphère. Il pourra se déplacer dans la troposphère (entre 0 et 15 km d'altitude) de manière horizontale de l'équateur aux pôles (*via* les cellules atmosphériques) et/ou verticale (*via* les courants ascendants) et ainsi parcourir une distance comprise entre 0 et 1000 km. Il pourra éventuellement rejoindre la stratosphère (entre 15 et 50 km d'altitude) et se déplacer à l'échelle mondiale. Le temps de résidence d'un composé dans l'atmosphère dépend de ses propriétés intrinsèques mais il finira par retomber au niveau de la pédosphère ou de l'hydrosphère sous

forme de dépôts secs (particules solides) ou humides (pluie, neige) (**Figure 6**) (Ramade, 2005, 2007b).

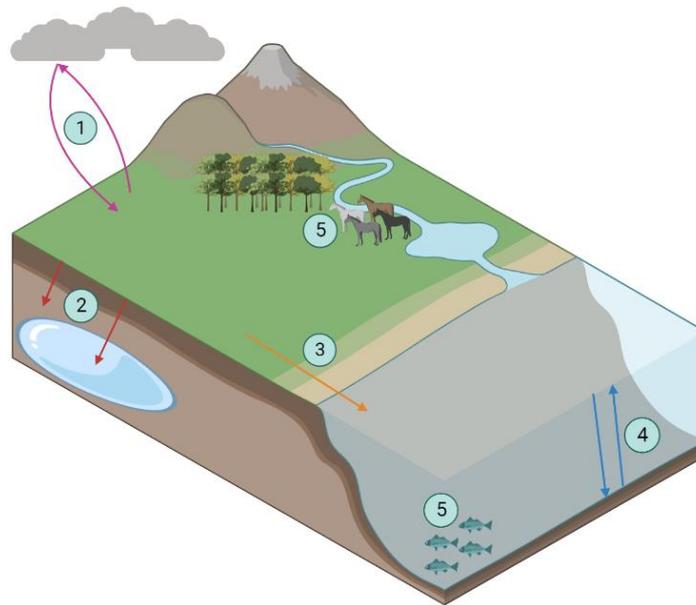


Figure 6. Déplacement des polluants dans la biosphère. ① Echange entre l'atmosphère et la pédosphère/l'hydrosphère. Les polluants peuvent être volatilisés et libérés dans l'atmosphère, et être transportés sur de plus ou moins longues distances. Ils retombent au niveau de la pédosphère ou de l'hydrosphère sous forme de dépôts secs ou humides. ② Les composés peuvent s'infiltrer dans des couches plus profondes du sol ou percoler jusqu'aux nappes d'eau souterraines. ③ Ils peuvent être lessivés sur la couche superficielle du sol jusqu'à l'hydrosphère. ④ Les composés peuvent sédimenter en se liant aux particules de matière organique et se concentrer dans les sédiments. Ils peuvent être relargués de manière passive ou *via* la remise en suspension des sédiments. ⑤ Les polluants sont transférés et peuvent être accumulés dans la biomasse vivante.

Lors de l'épandage ou de la retombée de l'atmosphère, les pesticides rejoignent la pédosphère. A partir de la surface du sol ces composés peuvent s'infiltrer dans les couches profondes du sol et éventuellement percoler jusqu'aux nappes d'eau souterraines. Ils peuvent également se déplacer par lessivage et rejoindre d'autres portions de la pédosphère ou l'hydrosphère. Une fois dans l'hydrosphère, les pesticides peuvent sédimenter (en se liant aux particules de matière organique) et se concentrer dans les sédiments. Ils seront alors relargués de manière passive ou de manière active par remise en suspension des sédiments (**Figure 6**) (Ramade, 2005, 2007b).

La pédosphère et l'hydrosphère sont donc des réservoirs de pesticides, mais ce ne sont pas nécessairement les réservoirs terminaux. En effet, les pesticides peuvent être transférés à la dernière composante de la biosphère : la biomasse. Ce transfert peut être direct (par contact) ou indirect (par voie trophique). Les pesticides peuvent être bioaccumulés (ou bioconcentrés si la concentration interne est supérieure à celle de l'environnement local) dans les premiers maillons

du réseau trophique (producteurs primaires) et être bioamplifiés (ou biomagnifiés) dans les maillons trophiques supérieurs (consommateurs).

b. Dégradation des pesticides :

Lors de leur déplacement dans la biosphère, les pesticides peuvent également être dégradés/transformés par des procédés physiques (photodégradation) (Katagi, 2004; Meng *et al.*, 2022) ou chimiques (oxydation, hydrolyse) (Chiron *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2022). De plus, lorsque ces composés sont transférés à la biomasse, ils peuvent être dégradés/métabolisés par les organismes vivants modifiant ainsi la bioaccumulation et la bioamplification le long du réseau trophique (Ramade, 2005, 2007b; Marican and Durán-Lara, 2017; Kaur *et al.*, 2021). Les métabolites ainsi produits peuvent également se déplacer dans la biosphère et avoir un impact sur la composante biotique de la biosphère.

La biodégradation des pesticides est associée au métabolisme des xénobiotiques et peut être réalisée par des microorganismes, des végétaux ou des animaux. Le métabolisme des xénobiotiques est constitué de trois phases distinctes qui peuvent varier en fonction de l'organisme considéré (en termes d'enzymes impliquées ou dans l'orientation de la phase III).

La phase I, ou phase de fonctionnalisation, correspond à une étape de transformation enzymatique du pesticide (ajout/retrait de groupes fonctionnels, clivages de liaisons particulières). Cette transformation favorise les propriétés hydrophobes ce qui peut augmenter la toxicité intrinsèque des métabolites issus de la phase I. Cette étape de fonctionnalisation est généralement liée à trois grandes familles enzymatiques : les oxydases (cytochrome P₄₅₀ monooxygénases, peroxydases, ...), les réductases (nitroréductases, déhalogénases réductrices, ...) et les hydrolases (carboxylestérases, amidases, ...). La phase II, ou phase de conjugaison, correspond à une étape de conjugaison médiée par des enzymes, cette modification de la structure va permettre de le rendre hydrosoluble (ce qui diminue systématiquement la toxicité intrinsèque des métabolites produits) et de faciliter son transport *via* l'ajout d'un groupement particulier. Diverses familles d'enzymes peuvent être impliquées dans cette étape de conjugaison des xénobiotiques : glutathion-S-transférases, glycosyltransférases, phosphotransférases, aminotransférases, UDP-glycosyltransférases, ... Trois types de phase III peuvent être mis en évidence : élimination, métabolisation et stockage. Chez les végétaux, la phase III correspond plutôt à une étape de compartimentation où les métabolites issus de la phase II seront stockés dans les différents tissus de la plante. Chez les microorganismes, la phase III est plutôt liée à la métabolisation, les métabolites issus de la phase II sont utilisés

comme source de nutriments et d'énergie par les microorganismes. Enfin, chez les animaux, la phase III est plutôt liée à l'élimination des métabolites issus de la phase II. Ces derniers vont être transportés de l'espace intracellulaire vers le milieu extracellulaire par des transporteurs (transporteur ABC notamment) pour rejoindre le système excréteur et ainsi être éliminés de l'organisme (VanEerd *et al.*, 2003; Duffus *et al.*, 2009b; Berenbaum and Johnson, 2015; Gong and Diao, 2017; Sharma *et al.*, 2020).

2. Etat de la contamination des sols et des eaux :

D'après des travaux de modélisation récents (Tang *et al.*, 2021), environ 75% des terres agricoles mondiales (soit environ 28,8 millions de km²) présentent un risque de pollution à au moins un pesticide et 31% (soit environ 12,1 millions de km²) présentent un risque de pollution majeur. Les modèles utilisés montrent également que l'Europe est une zone à risque pour la pollution des sols avec environs 62% des terres agricoles présentant un risque de pollution à au moins un pesticide. Cependant, les pesticides sont en général combinés pour garantir une meilleure efficacité. Il est donc nécessaire d'évaluer la contamination des sols non pas par un seul pesticide mais par un mélange. A l'échelle mondiale, environ 64% (soit environ 24,6 millions de km²) des terres agricoles présentent un risque de pollution à plus d'un pesticide et environ 21% (soit environ 8 millions de km²) à plus de dix pesticides. En Europe, 97% des terres agricoles présentant un risque de pollution aux pesticides présentent un risque pour plus d'un composé actif. Il est à noter que la zone du globe avec le risque de pollution le plus élevé est la Chine avec 8,4% des terres agricoles présentant un risque de pollution à plus de vingt pesticides différents.

Les écosystèmes aquatiques en périphérie des terres agricoles sont les premiers touchés par la dérive des produits phytosanitaires (Sánchez-Bayo, 2011b), particulièrement liée au phénomène de lessivage des sols que ce soit par des processus naturelles (pluies) ou agricoles (irrigation). En 2000, environ 67% des eaux douces de surface étaient utilisées dans un but agricole (ce chiffre pouvait atteindre 85 à 90% en Afrique et en Asie où l'irrigation joue un rôle très important). La mise en évidence de la contamination des eaux de surface est basée sur la quantification des pesticides et de certains de leurs métabolites et la comparaison avec des seuils réglementaires. Aux Etats-Unis, il a été estimé que les deux-tiers des eaux douces de surface étaient contaminées avec au moins un pesticide et que les trois-quarts des eaux douces de surface présentaient des métabolites de pesticides (témoins d'une contamination antérieure) (Rad *et al.*, 2022). En Europe, entre 10 et 30% des eaux douces de surface et environ 10% des

eaux souterraines sont contaminées par au moins un pesticide (Rad *et al.*, 2022; <https://www.eea.europa.eu/ims/pesticides-in-rivers-lakes-and>).

D. Phénylpyrazoles et pyréthrinoïdes, un focus sur deux familles d'insecticides neurotoxiques :

1. Cas du fipronil, un membre des phénylpyrazoles :

a. Histoire et toxicité :

Le fipronil ou 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluorométhyl)-phényl]-4-trifluorométhyl sulfanyl-1H-pyrazole-3-carbonitrile (C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS) est un insecticide neurotoxique de la famille des phénylpyrazoles (Saeed *et al.*, 2016). Il a été développé par la société française Rhône-Poulenc® à la fin des années 1980. Suite à sa mise sur le marché en 1993, le fipronil a été intégré dans de nombreuses formulations commerciales jusqu'à son interdiction en usage agricole en France en 2004 (puis en Europe en 2007) dû aux effets observés sur les mammifères (perturbations des fonctions neurologique, endocrine, rénale et hépatique) (Afssa and Afsse, 2005; Bonnard *et al.*, 2012; Simon-Delso *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2016). Il est à noter que le fipronil est toujours utilisé dans certains secteurs tels que la médecine vétérinaire ou l'usage domestique.

C'est un insecticide au spectre toxique large contre les insectes nuisibles (fourmis, puces, tiques, sauterelles, ...). Il présente également un spectre toxique large contre des vertébrés (petits mammifères, oiseaux, poissons, amphibiens) et des invertébrés d'importance agronomique (abeilles, bourdons, papillons, ...) (**Table 1**) (Gibbons *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2015).

Table 1. La toxicité du fipronil pour quelques exemples d'organismes. Les données sont proposées sous la forme de Dose Létale 50 % (DL₅₀) pour les organismes terrestres et de Concentration Létale 50% (CL₅₀) pour les organismes aquatiques (données provenant de Gibbons *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2015 et de la base de données *Pesticides Properties DataBase*, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/316.htm>).

Organisme	DL ₅₀ ou CL ₅₀
Mammifères	92 - 97 mg/kg
Oiseaux	11.3 - 2000 mg/kg
Poissons	0.042 - 310 mg/L
Reptiles	30 mg/kg
<i>Apis mellifera</i>	4.2 ng/abeille

b. Mode d'action :

Le fipronil est un insecticide systémique agissant sur le système nerveux. Il agit comme un antagoniste non-compétitif des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA-R). Le GABA est un des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs de l'influx nerveux chez les vertébrés et les insectes.

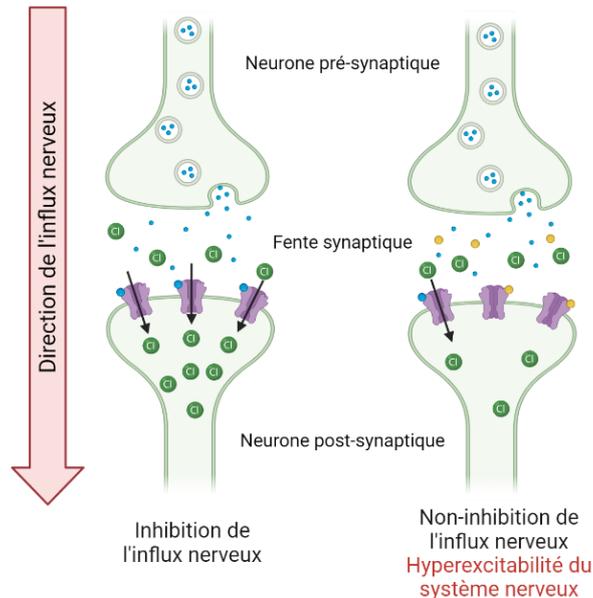


Figure 7. Représentation schématique du mode d'action du fipronil sur sa cible principale : les GABA-R. Dans un contexte physiologique normal (partie gauche de la figure), le GABA (ronds bleus) est libéré dans la fente synaptique par le neurone pré-synaptique et se lie sur son récepteur (icônes violettes) se trouvant dans la membrane du neurone post-synaptique. La fixation du ligand sur son récepteur permet l'entrée d'un flux d'ions chlorure de la fente synaptique vers le milieu intracellulaire du neurone post-synaptique. Ce flux d'ions permet d'inhiber l'influx nerveux. En cas d'exposition (partie droite de la figure) au fipronil (ronds jaunes), l'inhibition de l'influx nerveux ne peut avoir lieu ce qui se traduit par une hyperexcitabilité du système nerveux de l'organisme. En effet, le fipronil se lie aux GABA-R (sur un site de liaison différent de celui du GABA) et empêche l'ouverture de ces canaux ioniques. Le flux d'ions chlorure provenant de la fente synaptique est donc très limité et empêche la dépolarisation complète du neurone post-synaptique (Figure inspirée de Paris 2017).

Dans des conditions physiologiques normales, le GABA est sécrété par un neurone pré-synaptique et libéré dans la fente synaptique. Il se lie à un récepteur GABA présent sur la membrane du neurone post-synaptique. La liaison du ligand sur son récepteur entraîne un changement de conformation du récepteur et permet l'ouverture d'un canal membranaire perméable aux ions chlorures. Ce flux d'ions chlorures pénètre dans le neurone post-synaptique et modifie le potentiel membranaire (dépolarisation), conduisant ainsi à une inhibition de l'influx nerveux (**Figure 7**). Le fipronil a pour cible primaire les GABA-R, il se lie sur un site de liaison différent de celui du GABA pour empêcher l'ouverture des canaux chlorures. Le flux

d'ions chlorures entrant dans le neurone post-synaptique sera limité, entraînant une dépolarisation incomplète qui se traduit par un influx nerveux non-inhibé tendant vers une hyperexcitabilité du système nerveux (tremblements, convulsions, paralysie) pouvant conduire à la mort de l'organisme exposé. (**Figure 7**) (Casida and Durkin, 2013; Johnson, 2015). L'affinité du fipronil pour les GABA-R des invertébrés est bien supérieure (jusqu'à 1870 fois plus) à celle observée pour les GABA-R des mammifères. Dans le cas d'une exposition chez un mammifère, le flux d'ions chlorures sera moins modifié et les effets engendrés sur le système nerveux plus modérés, ce qui montre une certaine spécificité de ce pesticide pour la lutte contre les insectes nuisibles (Hainzl *et al.*, 1998; Ratra *et al.*, 2001; Gibbons *et al.*, 2015).

Le fipronil agit également sur une cible secondaire : les récepteurs ionotropiques au glutamate. Ces récepteurs permettent également le passage d'un flux d'ions chlorures de la fente synaptique vers le neurone post-synaptique mais sont activés par le glutamate. A la différence des GABA-R, les canaux glutamate sont présents uniquement chez les invertébrés ce qui témoigne de la spécificité du fipronil pour la lutte contre les insectes. Ces deux types de récepteurs sont spécifiques d'un ligand et fonctionnent de manière indépendante, l'inhibition par le fipronil d'un des types de récepteurs n'étant pas corrélée avec l'inhibition de l'autre type de récepteur (Narahashi *et al.*, 2010).

c. Dégradation du fipronil :

Une fois libéré dans l'environnement, le fipronil est dégradé (dans les compartiments sol et eau notamment) à la fois par des voies abiotiques (hydrolyse, photodégradation) et par des voies biotiques (métabolisation par les organismes) avec une demi-vie comprise entre 32 et 346 jours en fonctions des conditions expérimentales (Connelly, 2001; Simon-Delso *et al.*, 2015; Paris, 2017). Quatre métabolites majeurs ont été mis en évidence dans les cas de la dégradation du fipronil (**Figure 8**) : le fipronil-désulfinyl (issu de la photodégradation de la molécule mère), le fipronil-sulfone (issu de l'oxydation du groupe sulfinyl), le fipronil-sulfure (issu de la réduction du groupe sulfinyl) et le fipronil-amide (issu de l'hydrolyse du groupement cyanure). Le fipronil-amide pourra subir plusieurs étapes d'hydrolyse jusqu'à obtenir l'acide carboxylique correspondant (Connelly, 2001; Gunasekara *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Paris, 2017; Zhou *et al.*, 2021). Les données toxicologiques disponibles pour les métabolites du fipronil sont limitées mais semblent indiquer que le fipronil-sulfone et le fipronil-désulfinyl (ainsi que le fipronil-sulfide dans certains études) sont plus toxiques que la molécule mère chez les insectes, poissons, oiseaux et mammifères. A titre

d'exemple, ces deux métabolites sont respectivement indiqués comme 1,9 et 6,6 fois plus toxique pour les invertébrés aquatiques que le fipronil (Gunasekara *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2021).

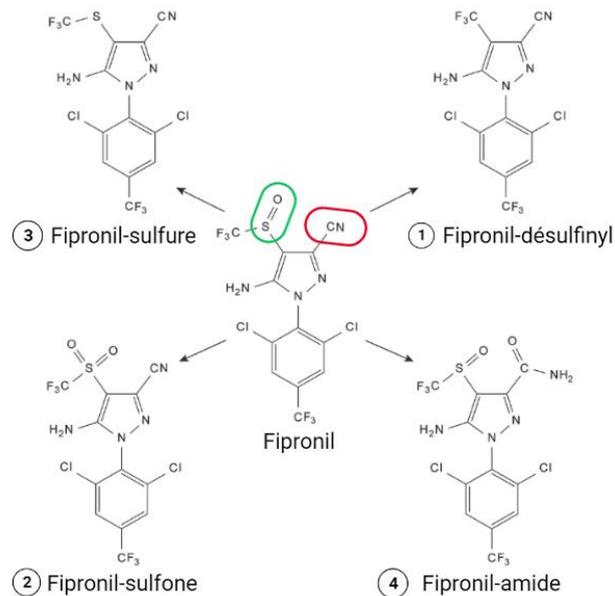


Figure 8. Représentation schématique de la dégradation du fipronil. Deux groupes caractéristiques sont isolés sur la représentation de la molécule de fipronil : le groupe sulfinyl (entouré en vert) et le groupe cyanure (entouré en rouge). ① Photolyse (perte du groupe sulfinyl par action de la lumière, demi-vie comprise entre 67 et 147 jours). ② Oxydation du groupe sulfinyl (ajout d'un atome d'oxygène transformant le groupe sulfinyl en groupe sulfone ; demi-vie comprise entre 147 et 422 jours). ③ Réduction du groupe sulfinyl (perte de l'atome d'oxygène transformant le groupe sulfinyl en soufre, demi-vie comprise entre 82 et 338 jours). ④ Hydrolyse du groupement cyanure (transformation du groupement cyanure en groupement amide, demi-vie comprise entre 160 et 266 jours) (figure modifiée d'après Cappelini *et al.*, 2018).

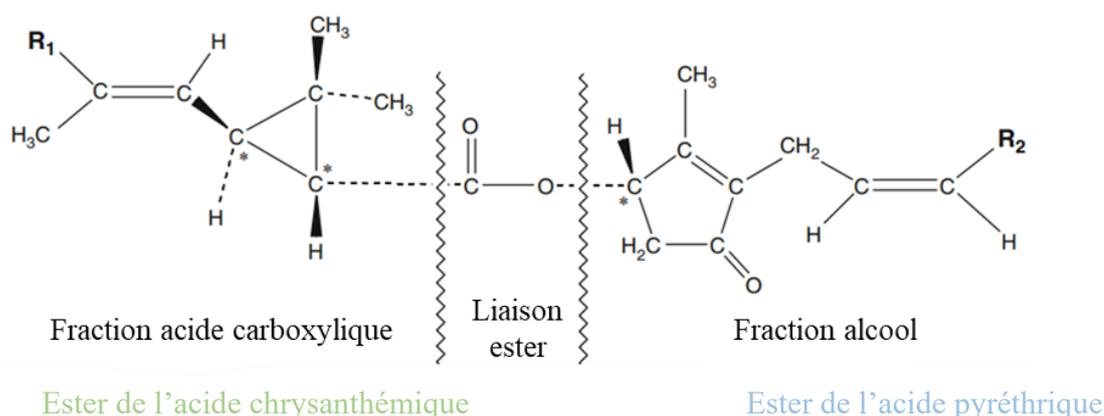
2. La famille des pyréthrinoïdes :

a. Histoire des pyréthrinoïdes :

Les pyréthrinoïdes forment une famille d'insecticides systémiques agissant sur le système nerveux (Casida and Durkin, 2013). Ce sont des composés de synthèse inspirés d'un mélange de molécules naturellement insecticides que l'on retrouve chez certaines espèces de chrysanthème (dont *Chrysanthemum cinerariaefolium*) : le pyrèthre (Casida *et al.*, 1983; Anadón *et al.*, 2009; Marchall Clark and Symington, 2012; Guven *et al.*, 2018; Lamberth, 2019). L'utilisation du pyrèthre est connue dans le monde depuis longtemps puisque des traces de son utilisation dans la Chine antique ou dans la Perse médiévale ont pu être mises en évidence. Son utilisation en Europe et en Amérique a, en revanche, été beaucoup plus tardive

puisqu'elle remonte à seulement deux siècles (Davies *et al.*, 2007; Katsuda, 2012; Palmquist *et al.*, 2012; Gajendiran and Abraham, 2018; Guven *et al.*, 2018).

La composition exacte du pyrèthre a pu être déterminée à la fin des années 1960 et comprend trois paires de molécules (**Figure 9**) : les pyréthrine I et II (découvertes en 1944 par La Forge et Barthel), les cinérine I et II (découvertes en 1945 par La Forge et Barthel) et les jasmoline I et II (découvertes par Godin et collaborateurs en 1966) (Katsuda, 2012; Matsuo, 2019). Ces molécules présentent toutes la même structure : une fraction acide carboxylique et une fraction alcool reliées par une liaison ester (**Figure 9**). Elles sont issues de l'estérification de l'acide chrysanthémique ou de l'acide pyréthrique avec un groupe alcool porté par le pyréthrolone, le cinérolone ou le jasmolone. Les trois composés du groupes I sont des esters de l'acide chrysanthémique alors que les composés du groupe II sont des esters de l'acide pyréthrique (Matsuda, 2012).



Composé	Groupement R1	Groupement R2	Composé	Groupement R1	Groupement R2
Pyréthrine I	CH ₃	CHCH ₂	Pyréthrine II	CH ₃ OC(O)	CH ₂ CH ₂
Cinérine I	CH ₃	CH ₃	Cinérine II	CH ₃ OC(O)	CH ₃
Jasmoline I	CH ₃	CH ₂ CH ₂	Jasmoline II	CH ₃ OC(O)	CH ₂ CH ₂

Figure 9. Structure chimique des composants du pyrèthre. Dans la partie haute de la figure est présentée la formule semi-développée générique des différents constituants du pyrèthre. Les différentes molécules composants le pyrèthre sont caractérisées par des groupements R1 et R2 présentés dans la partie basse de la figure (figure inspirée de Katsuda, 2012).

Le pyrèthre est caractérisé par une activité insecticide très rapide et très efficace contre de nombreux insectes nuisibles et une très faible toxicité pour les mammifères. Cependant, cette activité est freinée par une photostabilité très faible rendant son usage en agriculture impossible. Dès lors que la structure des molécules composant le pyrèthre fut déterminée, les chimistes se sont lancés dans le développement de molécules de synthèse plus stables inspirées de ces molécules naturelles : c'est la naissance et le développement des pyréthrinoïdes de synthèse.

L'alléthrine est le premier pyréthriinoïde à avoir été développé (produite en 1949 par La Forge et Schechter et commercialisé en 1952) et est le chef de file des pyréthriinoïdes de première génération dont la photostabilité est encore trop faible pour un usage en extérieur. La seconde génération de pyréthriinoïdes est apparue avec la perméthrine (produite en 1972 par Elliott et collaborateurs et commercialisé en 1977). Cette seconde génération est caractérisée par une photostabilité accrue et donc un usage agricole possible (Katsuda, 2012; Matsuo, 2019).

b. Classification des pyréthriinoïdes :

Les pyréthriinoïdes sont classés en deux groupes. Cette classification actuelle est basée sur la combinaison de deux classifications développées dans les années 1980.

La classification de Verschoyle et Aldridge (Verschoyle and Aldridge, 1980), basée sur le syndrome toxique engendré par une exposition aiguë au pyréthriinoïde chez les mammifères, permet de distinguer les pyréthriinoïdes de type T et les pyréthriinoïdes de type CS. Le syndrome de tremblements ou syndrome T (caractérisé par un comportement agressif, des tremblements, des convulsions, une ataxie et une hyperexcitation), apparaît après une exposition à un pyréthriinoïde de type T. Un syndrome de choréoathétose (mouvements involontaires et incontrôlés des extrémités) couplé à une importante salivation ou syndrome CS (caractérisé par une choréoathétose, une hypersalivation, une hypersensibilité et des myoclonies), apparaît dans le cas d'une exposition à un pyréthriinoïdes de type CS.

La classification de Lawrence et Casida (Lawrence and Casida, 1982), quant à elle est basée sur la structure chimique des pyréthriinoïdes, permet de discerner les pyréthriinoïdes de type I et de type II. Les pyréthriinoïdes de type II sont caractérisés par la présence d'un groupe α -cyano sur le groupe méthylène de la fraction alcool de la molécule. Ce groupement α -cyano est absent chez les pyréthriinoïdes de type I.

Les pyréthriinoïdes de type I sont en général affiliés au syndrome T alors que ceux de type II sont en général rapportés au syndrome CS. Cependant, le lien entre l'affiliation structurale (I/II) et l'affiliation symptomatique (T/CS) n'est pas parfaite car certains pyréthriinoïdes de type II engendrent un syndrome T voire une combinaison de symptômes correspondant à la fois au syndrome T et au syndrome CS (Verschoyle and Aldridge, 1980; Soderlund, 2012).

La **Figure 10** présente quelques exemples de pyréthriinoïdes de type I (alléthrine, perméthrine, bifenthrine) et de type II (λ -cyhalothrine, β -cyfluthrine, cyperméthrine, deltaméthrine, fenvalérate).

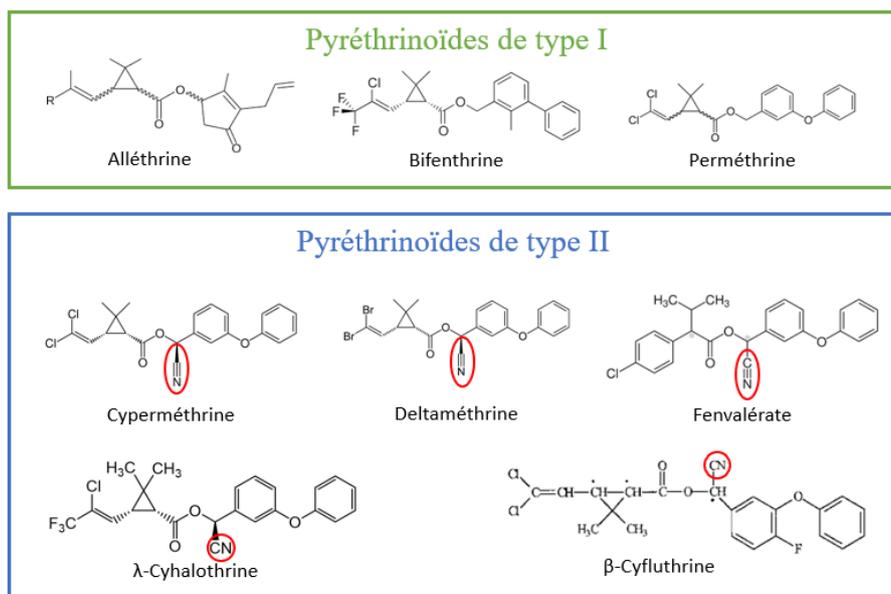


Figure 10. Exemples de pyrétroïdes de type I et de type II. Le groupe α -cyano, caractéristique des pyrétroïdes de type II est mis en évidence par un cercle rouge sur les molécules correspondantes.

c. Toxicité des pyrétroïdes :

Les pyrétroïdes sont des insecticides à spectre toxique large contre une grande diversité d'ordres d'insectes (coléoptère, diptère, homoptère, hétéroptère, lépidoptère, thysanoptère et orthoptère). Ils sont caractérisés par une très faible toxicité chez les mammifères, les oiseaux, les mollusques et les microorganismes et, *a contrario*, une très forte toxicité chez les organismes aquatiques (poissons, invertébrés, amphibiens) (**Table 2**) (Bradbury and Coats, 1989; Coats *et al.*, 1989; Day, 1989; Hirano, 1989; Mueller-Beilschmidt, 1990; Palmquist *et al.*, 2012; Tsuji *et al.*, 2012; Maund *et al.*, 2012; Mikita *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2013a; Thatheyus and Gnana Selvam, 2013; Antwi and Reddy, 2015; Gajendiran and Abraham, 2018; Lamberth, 2019).

Table 2. La toxicité des pyrétroïdes pour quelques groupes d'organismes. Les données sont proposées sous la forme de Dose Létale 50 % (DL₅₀) pour les organismes terrestres et de Concentration Létale 50% (CL₅₀) pour les organismes aquatiques (données provenant de Coats *et al.*, 1989; Day, 1989; Maund *et al.*, 2012; Tsuji *et al.*, 2012; Antwi and Reddy, 2015).

Organismes	DL ₅₀ ou CL ₅₀
Mammifères	19 - > 10 000 mg/kg
Oiseaux	680 - > 13 500 mg/kg
Vers de terre	8 - > 13 000 mg/kg
Poissons	0.17 - 314 µg/L
Insectes aquatiques	0.02 - 80 µg/L
Crustacés	0.0016 - 53 µg/L
Mollusques	3.4 - >10 000 µg/L

La toxicité des pyréthriinoïdes est fortement influencée par deux facteurs : la stéréoisomérisation de l'insecticide et la température. En effet, les pyréthriinoïdes possèdent au minimum deux carbones chiraux dans leur structure, conduisant à un minimum de quatre stéréoisomères. Les pyréthriinoïdes sont soit vendus sous forme de mélange racémique (chaque isomère est présent en même quantité) ou sous forme de produit contenant un isomère particulier. Chaque isomère possède ses propres caractéristiques en termes de toxicité (certains sont très toxiques alors que d'autres n'ont quasi aucun effet), les isomères en *cis*- étant en général plus toxiques que les isomères en *trans*- (Casida *et al.*, 1983; Mueller-Beilschmidt, 1990; Bradberry *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007; Anadón *et al.*, 2009; Katagi, 2012; Zhu *et al.*, 2020). La température a également un effet sur la toxicité des pyréthriinoïdes. Plus elle est basse, plus la toxicité des pyréthriinoïdes est importante (ce qui explique en partie la toxicité accrue chez les organismes aquatiques). Ceci peut être expliqué par le fait que lorsque la température est basse, la sensibilité du système nerveux augmente alors que le métabolisme ralentit et que les processus de détoxification deviennent moins efficaces (Bradberry *et al.*, 2005; Maund *et al.*, 2012; Tsuji *et al.*, 2012; Gajendiran and Abraham, 2018).

Il a été montré que les pyréthriinoïdes sont 2 250 fois plus toxiques pour les insectes que pour l'Homme (taille de l'organisme réduite, température corporelle plus basse et plus grande sensibilité des canaux sodiques voltage dépendant chez les insectes, taux d'absorption cutané faible et taux de métabolisation important chez l'Homme) (Bradberry *et al.*, 2005).

d. Mode d'action des pyréthriinoïdes :

Les pyréthriinoïdes sont des insecticides systémiques agissant sur le système nerveux. Ils interagissent principalement avec le fonctionnement des canaux sodiques voltage dépendant (CSVD) enchâssés dans la membrane des cellules nerveuses (Davies *et al.*, 2007).

Dans un contexte physiologique normal, ces CSVD participent à la mise en place du potentiel d'action permettant la propagation de l'influx nerveux (**Figure 11**). Lorsque les CSVD perçoivent un stimulus extracellulaire (signal électrique), ils changent de conformation et passent d'un état de repos à un état ouvert permettant le passage d'un flux d'ions sodium de l'espace extracellulaire vers le milieu intracellulaire (ouverture d'environ 1 à 2 ms). Le flux d'ions permet la mise en place d'un potentiel d'action qui se propage le long des axones jusqu'à la mise en place d'une réponse physiologique (contraction musculaire par exemple). Le potentiel d'action décroît ensuite avec la fermeture progressive des CSVD, ce qui stoppe naturellement la propagation de l'influx nerveux (retour au potentiel de repos). Dans le cas

d'une exposition à un pyréthrianoïde de type I (**Figure 11**), la fermeture des CSVD est incomplète (pas de retour à la conformation de repos) ce qui entraîne une ouverture prolongée (environ 10 fois la durée normale) des canaux et la mise en place d'une succession d'ouverture et donc de potentiels d'action (on parle de phénomène de décharge répétée). Ce phénomène est en général à l'origine des symptômes associés à un syndrome T. Dans le cas d'une exposition à un pyréthrianoïde de type II (**Figure 11**), on observe une ouverture prolongée dans le temps (environ 200 fois la durée normale) des CSVD ce qui entraîne un potentiel d'action continu associé à la dépolarisation complète des cellules nerveuses et donc au blocage de l'influx nerveux (aucun potentiel d'action ne peut être de nouveau généré). Ce phénomène est en général à l'origine des symptômes associés à un syndrome CS (Narahashi, 1971; Casida *et al.*, 1983; Bradberry *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007; Marchall Clark and Symington, 2012; Palmquist *et al.*, 2012; Soderlund, 2012; Zhu *et al.*, 2020).

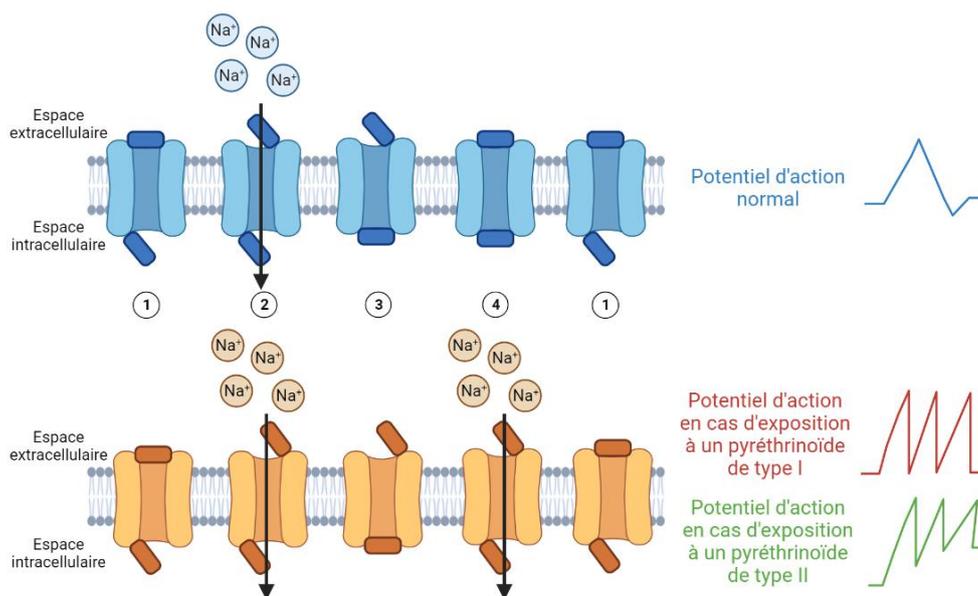


Figure 11. Mode d'action des pyréthrianoïdes sur le système nerveux. Dans la partie haute de la figure est présenté le fonctionnement des canaux sodiques dans un contexte physiologique normal. ① Position de repos ② Ouverture des CSVD après perception d'un stimulus extracellulaire et entrée d'un flux d'ions sodiums conduisant au développement d'un potentiel d'action ③ Inactivation du récepteur ④ Fermeture complète du récepteur. Dans la partie basse de la figure est présenté le fonctionnement des CSVD en présence de pyréthrianoïdes. Exposition à un pyréthrianoïde de type I : succession de potentiels d'action sans retour au potentiel de repos (phénomène de décharges répétées). Exposition à un pyréthrianoïde de type II : potentiel d'action continu (dépolarisation complète de la cellule) (figure inspirée de Ravula and Yenu, 2021).

Les pyréthrianoïdes de type I ciblent uniquement les CSVD, ce qui n'est pas le cas des pyréthrianoïdes de type II pour lesquels on observe diverses cibles secondaires telles que : les canaux calciques voltage dépendant, les canaux chlorure voltage dépendant, les récepteurs

périphériques aux benzodiazépines ou encore les récepteurs GABA (Devaud and Murray, 1988; Burr and Ray, 2004; Marchall Clark and Symington, 2012; Soderlund, 2012; Guven *et al.*, 2018).

e. Dégradation des pyréthriinoïdes :

Une fois libérés dans l'environnement les pyréthriinoïdes seront dégradés à la fois par des processus abiotiques (oxydation, photolyse) et biotiques (métabolisation par les organismes) (Mueller-Beilschmidt, 1990; Palmquist *et al.*, 2012; Gajendiran and Abraham, 2018). Les pyréthriinoïdes étant une famille d'insecticides riche (plus de 1000 composés) il est difficile de définir une liste exhaustive de métabolites issus de la dégradation des pyréthriinoïdes (les plus courants étant l'acide 3-phénoxybenzoïque et le 3-phénoxybenzaldéhyde). En revanche, le procédé de biodégradation par les organismes est toujours le même. Il se fait essentiellement en deux étapes avec une fonctionnalisation de la molécule mère liée à l'action combinée d'une carboxylestérase et du cytochrome P₄₅₀ monooxygénase suivie d'une réaction de conjugaison permettant le stockage, l'élimination ou la métabolisation des métabolites produits (Katagi, 2012; Mikita *et al.*, 2012; Palmquist *et al.*, 2012; Thatheyus and Gnana Selvam, 2013; Cycon and Piotrowska-Seget, 2016; Gajendiran and Abraham, 2018; Tang *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020).

II. Les auxiliaires des écosystèmes, indicateurs de l'impact des pesticides :

Dans la partie précédente, nous avons abordé les inconvénients liés à l'usage des pesticides en agriculture. Etudier l'impact des pesticides sur les écosystèmes et leur fonctionnement est extrêmement complexe (présence de nombreux facteurs incontrôlés et confondant *in situ*). Il est cependant possible de tenter d'extrapoler des informations en se basant sur un groupe particulier d'organismes : les auxiliaires des écosystèmes. Dans cette partie nous allons dans un premier temps introduire la notion d'auxiliaire des écosystèmes puis nous décrirons un peu plus en détail deux auxiliaires particuliers : l'abeille domestique *Apis mellifera* et les bactéries du sol avec le cas de *Pseudomonas fluorescens*.

A. Les auxiliaires des écosystèmes :

Il n'existe pas, dans la littérature, de définition précise concernant les auxiliaires des écosystèmes. Elle peut cependant être interprétée comme une généralisation de la notion d'auxiliaire des cultures très bien connue en agronomie et agroécologie. Dans ce contexte, un auxiliaire des cultures se définit au sens large comme : « Un organisme vivant qui fournit des services écosystémiques permettant de faciliter la production agricole. Il remplace tout ou partie du travail et des intrants apportés par l'agriculteur. Cette définition englobe des microorganismes et des invertébrés antagonistes de bioagresseurs ainsi que des vertébrés tels que certains oiseaux, mammifères et amphibiens se nourrissant de ravageurs ou de graines d'adventices. On y retrouve aussi les insectes pollinisateurs qui permettent la fécondation de plantes cultivées » (Joseph *et al.*, 2018). Cette définition peut être qualifiée d'anthropocentrée *via* la notion de service écosystémique : « Les biens et services que les Hommes peuvent tirer des écosystèmes, directement ou indirectement, pour assurer leur bien-être (nourriture, qualité de l'eau, paysages, ...) » (Sirami *et al.*, 2016).

Par extension et généralisation, on peut alors définir les auxiliaires des écosystèmes comme : « Tout organisme participant à un (des) processus clé(s) impliqué(s) dans le fonctionnement des agro-systèmes et/ou des écosystèmes « naturels » et au maintien de leur biodiversité ».

B. Cas d'un pollinisateur, l'abeille mellifère *Apis mellifera* :

1. A. mellifera, un auxiliaire des écosystèmes sous pression ?

a. La pollinisation, un service écosystémique essentiel :

La reproduction sexuée chez les végétaux est très fortement liée à la pollinisation (qu'elle soit ou non assistée par des organismes vivants ou des processus physiques). La pollinisation par les insectes est un élément important à la fois chez les plantes sauvages (maintien de la biodiversité végétale) et les plantes cultivées (maximisation des rendements). Un des insectes pollinisateurs parmi les plus importants est l'abeille, et plus particulièrement l'abeille domestique (ou abeille mellifère) *Apis mellifera* qui est un insecte eusocial (vit en colonie pouvant compter plus de 50 000 individus) de l'ordre des hyménoptères. Outre son rôle écologique important dans le maintien de la biodiversité et de la production végétale, l'abeille mellifère est un des principaux pollinisateurs dans les agro-systèmes monocultureux (pratique

agricole majeure à l'échelle mondiale). *A. mellifera* est également un insecte d'importance économique dans la filière apicole, avec la production de nombreux produits commercialisables en agroalimentaire ou en médecine : miel, cire, pollen, propolis, gelée royale (Richards, 2001; Morandin and Winston, 2006; Klein *et al.*, 2007; VanEngelsdorp and Meixner, 2010; Ollerton *et al.*, 2011; Ollerton, 2017; Hung *et al.*, 2018; Rouzé, 2020; Khanna *et al.*, 2021). La perte de ces abeilles aurait donc un impact important sur l'alimentation humaine et animale.

b. Le déclin des populations d'abeilles mellifères :

A. mellifera, via la pollinisation, participe à la production de plus de 30% des aliments consommés par l'Homme (VanEngelsdorp and Meixner, 2010). Malgré son importance écologique et son intérêt agronomique, un déclin des populations d'abeilles domestiques est observé en Amérique du Nord et en Europe depuis un trentaine d'années. Ce déclin peut être expliqué par des facteurs biotiques et abiotiques et leurs combinaisons (**Figure 12**) (Potts *et al.*, 2010; VanEngelsdorp and Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Douglas *et al.*, 2020).

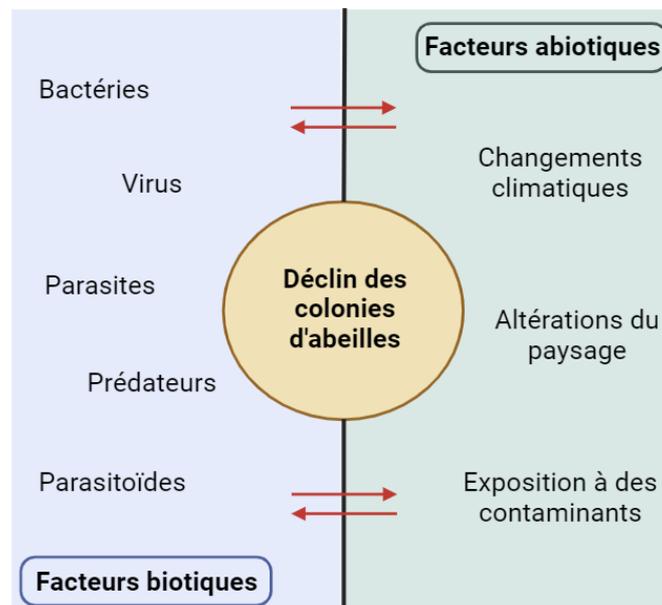


Figure 12. Les principaux facteurs biotiques et abiotiques participants au déclin des populations d'abeilles domestiques. Les flèches rouges symbolisent les potentielles interactions entre les différents facteurs mis en cause.

i. Facteurs biotiques :

L'abeille est en contact direct avec des stressseurs biotiques, représentés par des pathogènes, des prédateurs ou des parasitoïdes.

Parmi les organismes pathogènes, on distingue deux grands types d'infections bactériennes chez les abeilles, celle liée à *Melissococcus plutonis* et celle liée à *Paenibacillus larvae*. Ce sont respectivement les agents mis en cause dans la loque européenne et américaine, pathologies entraînant la perte importante de couvain dans les colonies infectées (Rouzé, 2020).

Il existe également une grande diversité de virus entraînant diverses pathologies chez les abeilles, comme par exemple : le CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*), le SBV (*Sac Brood Virus*), le BQCV (*Black Queen Cell Virus*) ou encore le DWV (*Deformed Wing Virus*). Ces virus peuvent être transmis soit de manière verticale (par une reine infectée) ou horizontale (par l'environnement ou *via* un parasite vecteur) (Rouzé, 2020).

De même, deux types de parasites : les ectoparasites (comme *Varroa destructor*) et les endoparasites (comme les microsporidies du genre *Nosema*), peuvent être rencontrés chez l'abeille. Ces parasites n'ont en général pas d'effet létal sur l'abeille mais peuvent grandement réduire sa *fitness* (Rouzé, 2020).

De plus, l'abeille domestique européenne est aujourd'hui en contact avec un prédateur d'importation, le frelon asiatique *Vespa velutina*. En revanche, à l'heure actuelle, aucun parasitoïde associé à *A. mellifera* n'a été détecté en Europe (ce qui n'est pas le cas en Amérique du Nord : présence de la mouche parasitoïde *Apocephalus borealis*) (Rouzé, 2020).

ii. Facteurs abiotiques :

Plusieurs types de facteurs abiotiques peuvent être liés au le déclin des populations d'abeilles, les principaux sont :

- Le changement climatique : favorise l'apparition d'évènements climatiques extrêmes (augmentation des températures et sécheresse accrue ou précipitations importantes). Ces paramètres climatiques peuvent avoir un impact direct sur l'activité et le comportement des abeilles ou indirect en modifiant la qualité et la quantité des ressources nutritives (baisse de la biodiversité végétale) (Le Conte and Navajas, 2008; Flores *et al.*, 2019; Rouzé, 2020) ;
- L'altération du paysage : l'urbanisme et les pratiques agricoles conventionnelles ont un impact important sur l'environnement. Ces activités anthropiques sont également associées à une baisse de la diversité végétale (impact sur la qualité et la quantité de nourriture) (Holzschuh *et al.*, 2007; Dudley and Alexander, 2017; Rouzé, 2020) ;
- La contamination par les pesticides et les métaux lourds : la présence de ces xénobiotiques peut avoir un impact direct sur la physiologie ou le comportement des

abeilles (Rashed *et al.*, 2009; Sánchez-Bayo and Goka, 2014; Feldhaar and Otti, 2020; Rouzé, 2020).

2. Exposition des abeilles aux pesticides :

Chez l'abeille domestique, il existe quatre voies principales d'exposition aux pesticides (**Figure 13**).



Figure 13. Principales voies d'exposition de *A. mellifera* aux pesticides (figure extraite de Johnson 2015).

(i) Les abeilles butineuses peuvent, dans un premier temps, être exposées de manière aiguë à l'extérieur de la ruche lors de l'activité de butinage. Elles sont alors directement en contact avec le pesticide lors de l'épandage ou avec des gouttelettes déposées sur les plantes juste après l'épandage. (ii) Dans un second temps, les abeilles butineuses peuvent être exposées de manière chronique *via* leur activité de butinage, que ce soit lors de la récolte d'eau contaminée suite au lessivage des sols ou des matrices végétales (notamment dans le cas des composés systémiques qui diffusent dans les matrices végétales tout au long du développement). (iii) Une fois le vol de butinage terminé, les abeilles butineuses retournent à la ruche contaminant ainsi de manière chronique l'ensemble de la colonie, que ce soit par voie topique (contact direct des abeilles avec les butineuses, par contact avec la cire ou la propolis contaminée) ou par voie trophique (*via* le pollen, le nectar, le miel, la gelée royale, le pain d'abeille) (**Figure 14**). (iv) Enfin, les abeilles de la ruche peuvent être volontairement exposées par les apiculteurs, de manière aiguë/chronique à des composés « pharmaceutiques » (acaricide

notamment) pour réguler les infections parasitaires (Krupke *et al.*, 2012; Sánchez-Bayo and Goka, 2014; Johnson, 2015; Calatayud-Vernich *et al.*, 2018; Murcia Morales *et al.*, 2020).

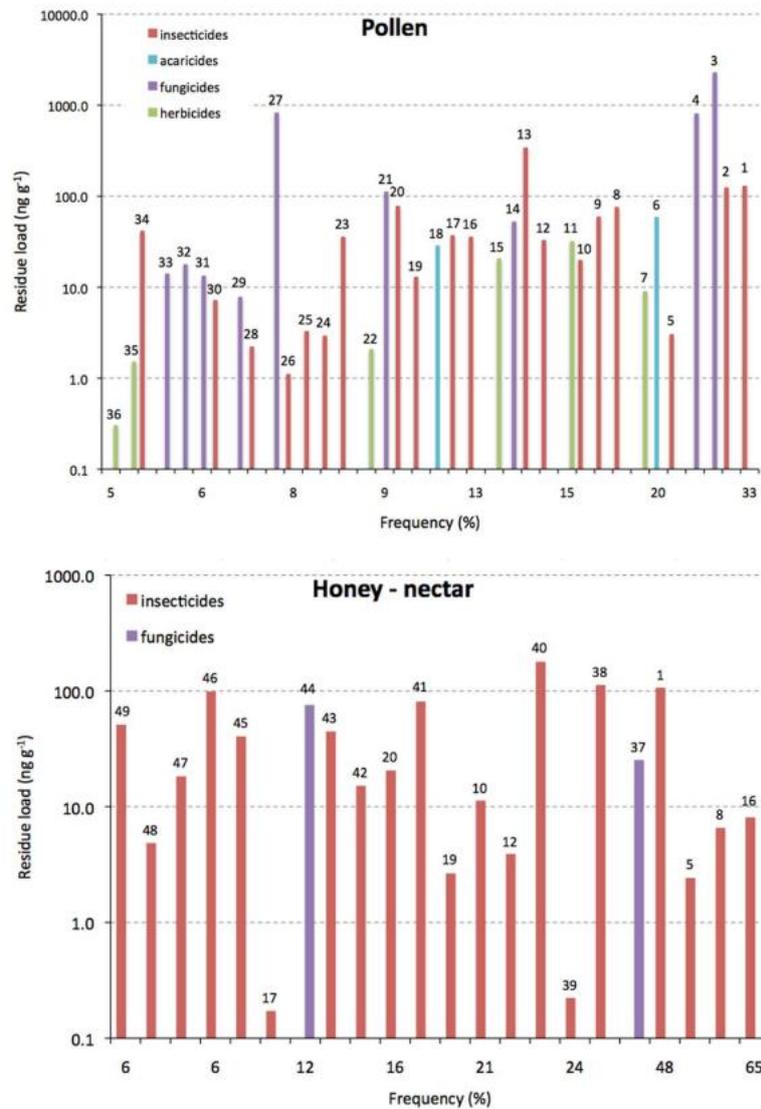


Figure 14. Pesticides retrouvés dans trois produits de la ruche : le pollen sur la partie haute de la figure et le miel et le nectar sur la partie basse. Les pesticides sont présentés en ng de pesticide/g de matrice en fonction de la fréquence à laquelle ils sont retrouvés dans les échantillons. Les chiffres sont associés à des pesticides particulier : 1 coumaphos, 2 tau-fluvalinate, 3 thymol, 4 chlorothalonil, 5 acétamipride; 6 amitraze, 7 dithiopyr, 8 thiaclopride, 9 carbaryl, 10 imidaclopride, 11 pendimethaline, 12 chlorpyrifos, 13 phosmet, 14 carbendazime, 15 atrazine, 16 thiaméthoxame, 17 chlorfenvinphos, 18 fenpyroximate, 19 clothianidine, 20 endosulfan, 21 méthylthiophanate, 22 métolachlore, 23 fenpropathrine, 24 methoxyfenozide, 25 esfenvalérate, 26 tébufénozide, 27 captan, 28 bifenthrine, 29 azoxystrobine, 30 lambda-cyhalothrine, 31 diphénylamine, 32 penconazole, 33 trifloxystrobine, 34 fenthion, 35 norflurazon, 36 métribuzine, 37 hexachlorobenzène, 38 HCH (alpha and beta), 39 phorate, 40 gamma-HCH (lindane), 41 hepténophos; 42 méthiocarbe, 43 DDT, 44 vinchlozoline, 45 méthidathion, 46 malathion, 47 cyperméthrine, 48 diméthoate, 49 carbofuran (figure et légende extraites de Sanchez-Bayo and Goka 2014).

3. Effet du fipronil sur *A. mellifera* :

Dans l'environnement, les abeilles sont exposées à une multitude de pesticides, dans ce manuscrit nous allons nous focaliser sur le cas d'un insecticide neurotoxique : le fipronil.

a. Effet aigu du fipronil sur la survie :

Le fipronil est un insecticide systémique extrêmement toxique pour *A. mellifera* avec une DL₅₀ estimée à 4,2 ng/abeille (Pisa *et al.*, 2015). Cependant, l'exposition des abeilles à cet insecticide se fait rarement à des doses aussi importantes. Dans l'environnement ou dans la ruche, les doses d'exposition sont plus faibles.

b. Effets chroniques du fipronil :

Les effets chroniques du fipronil peuvent être classés en grands groupes : effet sur la survie, sur le comportement, sur la reproduction et le développement, sur l'immunité, sur le métabolisme, sur la structure et le développement tissulaire et sur la structure du microbiote intestinal (**Figure 15**).

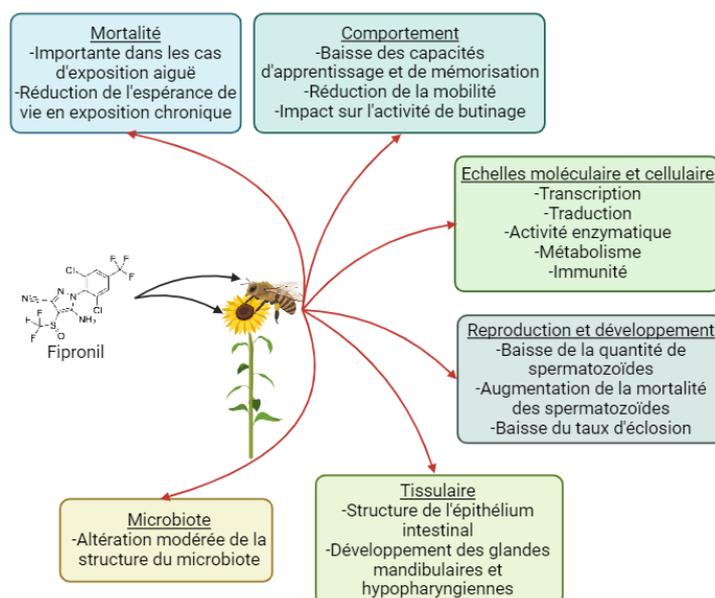


Figure 15. Schéma bilan des principaux effets aigus et chroniques du fipronil chez *A. mellifera*.

Une exposition chronique au fipronil a un impact sur la durée de vie des abeilles. Les abeilles exposées voient leur temps de survie diminué significativement de manière dose-dépendante (Decourtye *et al.*, 2005, 2011; Aliouane *et al.*, 2009).

Le fipronil entraîne également des altérations du comportement telles qu'une baisse des capacités d'apprentissage et de mémorisation (marquées par une diminution de la capacité à discriminer les odeurs ou une perte de l'orientation) (Decourtye *et al.*, 2005, 2009; El Hassani *et al.*, 2005; Aliouane *et al.*, 2009; Bernadou *et al.*, 2009) et une baisse de l'activité locomotrice (Aliouane *et al.*, 2009). Ces altérations comportementales impactent fortement l'activité de butinage (Colin *et al.*, 2004).

Le fipronil est associé à une perturbation de la fonction reproductive (baisse de la quantité et de la viabilité des spermatozoïdes chez les faux-bourçons) et à une baisse du taux d'éclosion des œufs et de la formation de stades plus avancés (pupes notamment) (Zaluski *et al.*, 2015; Kairo *et al.*, 2016, 2017) ce qui peut impacter le maintien de la colonie.

Le fipronil, semble également avoir un impact sur l'immunité, et plus particulièrement sur l'expression des gènes associés à la fonction immunitaires (gènes codant des peptides antimicrobiens ou des enzymes de défenses essentielles) (Aufauvre *et al.*, 2014; Zaluski *et al.*, 2015), et donc perturber la capacité des abeilles à se défendre contre des organismes pathogènes.

Le fipronil perturbe également l'expression de gènes et la production de protéines en lien avec le métabolisme énergétique, de détoxification ou de gestion du stress oxydant (Zaluski *et al.*, 2020; Astolfi *et al.*, 2022) et réduit aussi le taux de respiration mitochondriale (Nicodemo *et al.*, 2014). L'impact du pesticide sur le métabolisme se traduit ainsi par une faiblesse généralisée de l'organisme.

Le fipronil engendre une atteinte tissulaire au niveau de l'épithélium intestinal (mort des cellules) conduisant à une baisse d'absorption des nutriments (Da Silva Cruz *et al.*, 2010). Il altère également le développement des glandes mandibulaires et hypopharyngiennes chez les abeilles nourricières ce qui modifie leur capacité à produire et sécréter de la gelée royale, cela a un impact direct sur l'alimentation des larves et entraîne un changement précoce de spécialisation chez les abeilles nourricières exposées (Zaluski *et al.*, 2017).

Enfin, le fipronil semble avoir un effet modéré sur la structure du microbiote intestinal des abeilles (Rouzé *et al.*, 2019).

C. Les bactéries du sol et *Pseudomonas fluorescens* :

1. Les bactéries du sol, des auxiliaires des écosystèmes ?

a. L'habitat sol :

Le sol est un habitat hétérogène à la structure complexe composé d'un mélange de sable, de limon, d'argile, de matière organique et de matière minérale (**Figure 16**). Il est caractérisé par une faible quantité de nutriments et des propriétés physico-chimiques variables donnant naissance à une importante diversité de micro-habitats. Ces micro-habitats sont colonisés par une grande diversité d'organismes (microbiens notamment) aux fonctions variées. Les organismes peuplant cet écosystème ne sont pas répartis de manière homogène et se concentrent dans des points chauds (*hot spots*) où la quantité de nutriments est importante (rhizosphère notamment) (Nannipieri *et al.*, 2003; Barrios, 2007; Effmert *et al.*, 2012; Tyc *et al.*, 2017; Wilpiszski *et al.*, 2019).

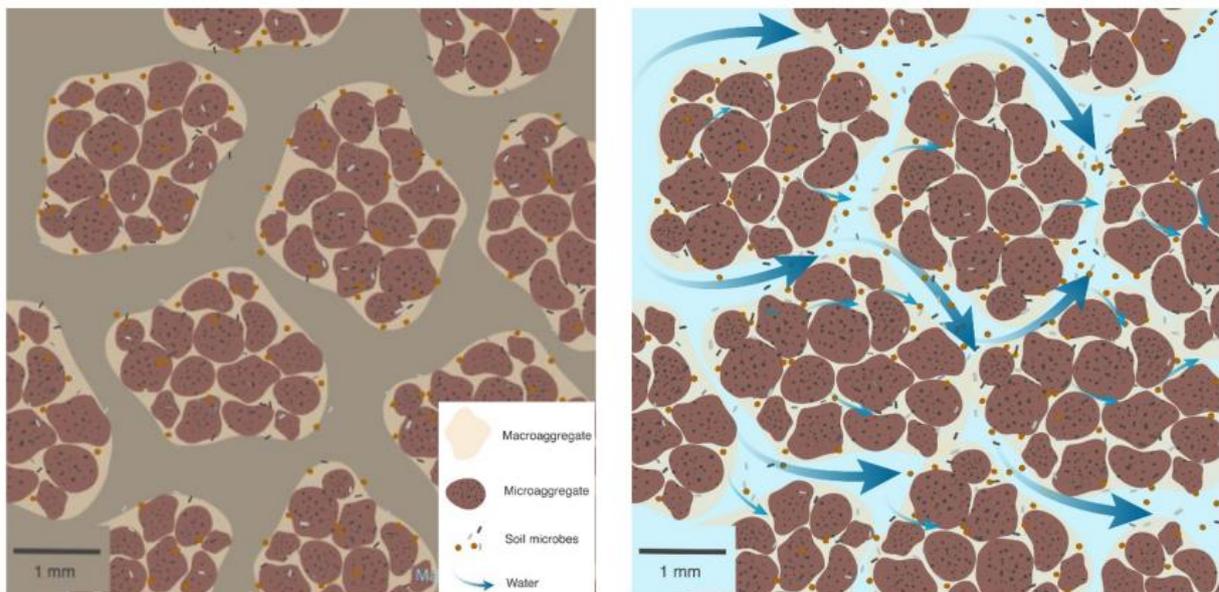


Figure 16. Représentation schématique synthétique de la structure du sol. Le sol est constitué d'agrégats de tailles variables. On parle de micro-agrégats lorsque leur taille est inférieure à 250 μm et de macro-agrégats lorsque leur taille est comprise entre 250 μm et 2 mm. Les micro-agrégats sont formés par agrégation de matières minérale et organique et peuvent se lier (notamment *via* des interactions électrostatiques) les uns aux autres pour former des macro-agrégats. Entre les agrégats (qu'ils soient micro- ou macro-), on trouve des pores et des galeries (mise en place par les ingénieurs du sol) permettant le passage des fractions liquide et gazeuse du sol. Les micro-agrégats ont un rôle important dans la séquestration du carbone organique (empêche sa dispersion) alors que les macro-agrégats régulent les flux d'eau et la diffusion de l'oxygène au sein des micro-agrégats (figure extraite de Wilpiszski *et al.*, 2019).

Il est possible de classer les organismes du sol en fonction de leur taille : la microfaune (< 200 µm, bactéries, champignons, archées, protistes), mésofaune (200 µm - 2 mm, acariens, collemboles) et macrofaune (> 2 mm, vers de terre). Il est également possible de les classer par groupes fonctionnels. On trouve notamment les symbiontes (mycorhizes, bactéries symbiotiques fixatrices d'azote), les décomposeurs (bactéries dégradant et transformant la matière organique), les ingénieurs du sol (organismes participant à l'élaboration de la structure du sol et à la fragmentation de la matière organique), les nuisibles et pathogènes (microorganismes phytopathogènes, vers phytophages) et les régulateurs (protistes phagotrophes, parasites, prédateurs, parasitoïdes) (Brussaard *et al.*, 1997; Bünemann *et al.*, 2006; Barrios, 2007).

Les microorganismes du sol ont des rôles prépondérants dans le maintien de la structure et du fonctionnement de l'écosystème sol. Ils sont présents en grande quantité (80 à 90% de la biomasse microbienne du sol) dans les *hot spots* de la couche superficielle du sol (0 - 10 cm) et sont représentés par une grande diversité taxonomique : on peut trouver plus de 10^{11} cellules bactériennes et fongiques par gramme de sol avec une diversité comprise entre 10^5 et 10^6 espèces bactériennes et fongiques (Nannipieri *et al.*, 2003; Barrios, 2007; Peñuelas *et al.*, 2014; Wilpiseski *et al.*, 2019).

b. Bactéries du sol, des auxiliaires des écosystèmes ?

Les bactéries du sol sont des auxiliaires participant aux fonctionnements des cycles biogéochimiques (recyclage de la matière organique) et sont partie intégrante d'interactions favorisant la croissance des végétaux.

Les cycles biogéochimiques correspondant au cycle de vie d'un élément et plus particulièrement le passage du dit élément de sa forme minérale vers sa forme organique puis de sa forme organique vers sa forme minérale. Ces cycles sont liés à des processus biologiques, géologiques et chimiques et prennent place dans les différents compartiments de la biosphère (dont le sol). Ils sont essentiels au développement et au maintien de la vie sur Terre. Ils peuvent être découpés en quatre étapes qui peuvent être symbolisées par un réseau trophique simplifié (**Figure 17**) : (i) Conversion de la matière minérale en matière organique (c'est le cas des producteurs primaires). (ii) Cette matière organique produite est ensuite intégrée dans d'autres organismes que l'on nomme consommateurs. (iii) A la fin du cycle de vie, ils meurent et libèrent une matière organique « morte » qui est alors fragmentée et intégrée par les organismes décomposeurs (cas des microorganismes du sol). (iv) La métabolisation complète de la matière

organique morte conduit à sa minéralisation. Le cycle peut alors reprendre. Les étapes iii et iv de ces cycles correspondent au processus que l'on nomme recyclage de la matière organique. Les microorganismes (bactéries notamment) par leur diversité métabolique (et enzymatique) peuvent intervenir dans chacune des étapes de ce cycle (**Figure 17**) et sont fortement liés aux quatre principaux cycles biogéochimiques : carbone, azote, phosphore et soufre. A titre d'exemple, on estime que 90% du carbone minéralisé dans les sols est issu de l'action des microorganismes (Brussaard *et al.*, 1997; Barrios, 2007; Madsen, 2011; Maier, 2015).

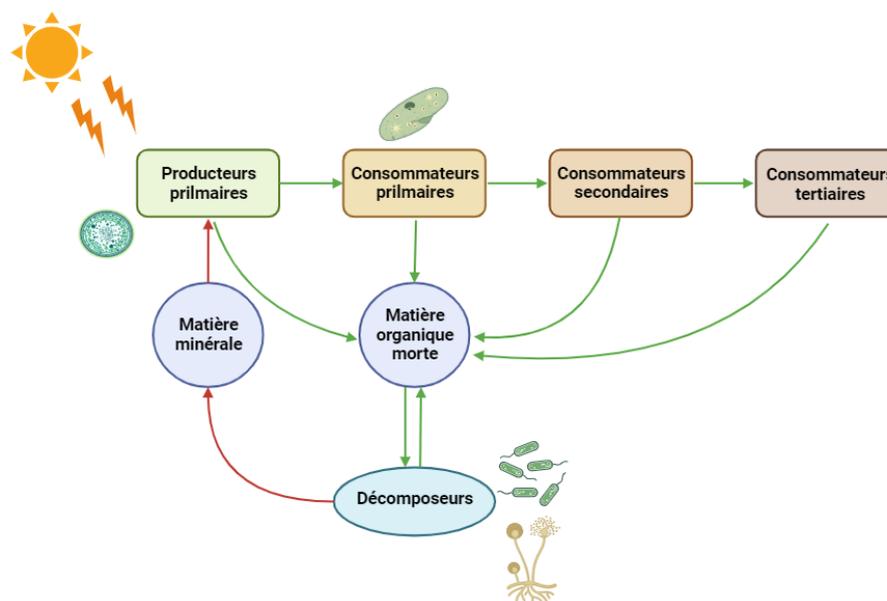


Figure 17. Réseau trophique simplifié présentant les quatre grandes étapes des cycles biogéochimiques. Les flèches vertes symbolisent les flux de matière organique. Les flèches rouges symbolisent les flux de matière minérale. Les producteurs primaires (cas des cyanobactéries) génèrent de la matière organique sous forme de biomasse à partir de matière minérale, d'énergie lumineuse et de dioxyde de carbone. La matière organique générée est consommée (intégrée) par un réseau de consommateurs (illustré ici par un protiste phagotrophe). La biomasse morte est fragmentée et intégrée par les décomposeurs (bactéries, champignons). La métabolisation complète de cette matière organique morte conduit à sa minéralisation (bactéries, champignons). La matière minérale ainsi formée est utilisée par les producteurs primaires pour former de la biomasse.

Les bactéries de la rhizosphères (plus particulièrement les *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, PGPR) sont impliquées dans diverses interactions bénéfiques avec les végétaux (**Figure 18**). Ces bactéries facilitent l'accès de certains nutriments *via* des transformations enzymatiques ou la mise en place de symbiose ce qui favorise l'absorption chez les plantes. Elles participent également activement au recyclage de la matière organique favorisant l'apparition de matière minérale essentielle à la croissance des végétaux. Elles ont un rôle dans la stimulation des systèmes de défense de la plante et dans sa capacité à répondre à divers stress (biotique et abiotique). Ces bactéries interagissent également avec les microorganismes

phytopathogènes du sol (bactéries et champignons) et peuvent inhiber leur croissance et/ou produire des composés biocides (antibactériens ou antifongiques). D'une manière générale, ces bactéries peuvent stimuler la croissance et améliorer la *fitness* globale des végétaux (Miransari, 2011; Toor and Adnan, 2020).

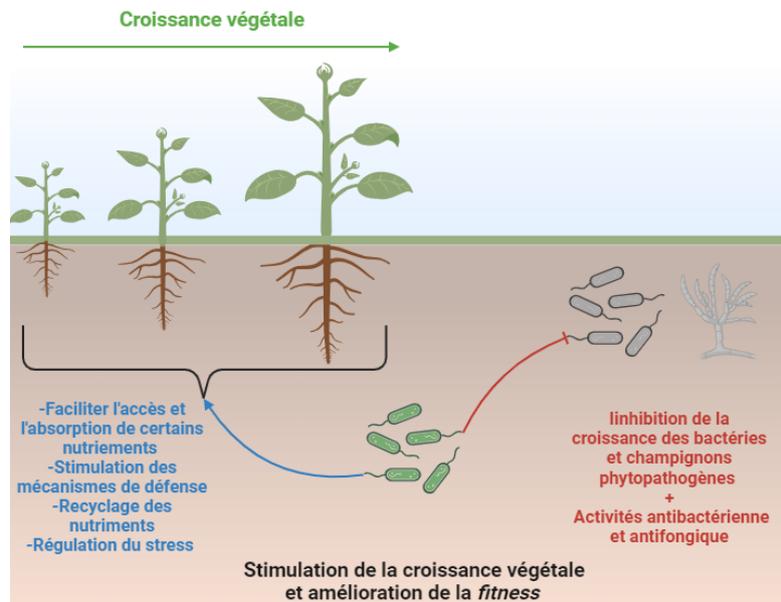


Figure 18. Schéma bilan des interactions entre les bactéries de la rhizosphère (PGPR) et les végétaux.

c. Focus sur *Pseudomonas fluorescens* :

Pseudomonas fluorescens est une bactérie de la classe des γ -protéobactéries. C'est un bacille à Gram négatif, mobile (présence d'un ou plusieurs flagelle(s)), non-sporulant, aérobic strict, psychrophile (peut se développer entre 4 et 42°C avec un optimale de croissance compris entre 25 et 30°C) et de type trophique chimioorganohétérotrophe. Son nom d'espèce provient de sa capacité à produire un sidérophore chromophore (la pyoverdine) qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé aux rayons ultraviolets (Depayras, 2019).

Du fait de ses caractéristiques et de sa grande capacité d'adaptation, *P. fluorescens* est décrite comme étant une bactérie ubiquitaire. Elle est fréquemment rencontrée dans les sols (rhizosphère) et la phyllosphère. Comme les autres bactéries du sol, *P. fluorescens* est impliquée dans le recyclage de la matière organique et donc dans les cycles biogéochimiques. Elle est classée parmi les PGPR du fait de sa capacité à entrer en compétition avec les organismes phytopathogènes (compétition pour les nutriments, production de composés antifongiques) et à stimuler la croissance des végétaux (Walsh *et al.*, 2001; Raaijmakers *et al.*, 2002; Couillerot *et*

al., 2009; Gera Hol *et al.*, 2013). *P. fluorescens* peut donc être considéré comme un auxiliaire des écosystèmes.

2. Impact des pesticides sur les bactéries du sol :

Le sol est le réservoir primaire des pesticides. Les organismes qui le colonisent sont donc les premiers touchés par la libération de ces composés. De nombreux organismes non-cibles, dont les bactéries, sont alors directement mis en contact avec ces substances actives (Bünemann *et al.*, 2006; Sánchez-Bayo, 2011b). Il est très difficile de tirer des conclusions générales sur l'impact des pesticides sur les bactéries du sol (nécessite des études au cas par cas), y compris dans les cas de mélange. En effet, l'impact observé dépend de nombreux paramètres tels que les propriétés physico-chimiques du pesticide, sa concentration, sa persistance, sa biodisponibilité, la structure du sol, les communautés microbiennes présentes, la température, le pH, l'humidité, le temps, ... En revanche, les toxicologues et écotoxicologues peuvent évaluer l'impact de ces molécules actives en se basant sur trois caractéristiques ou descripteurs : l'abondance bactérienne, la structure des communautés bactériennes et l'activité bactérienne (**Figure 19**) (Cycon and Piotrowska-seget, 2007; Carles, 2017; Shahid and Khan, 2022).

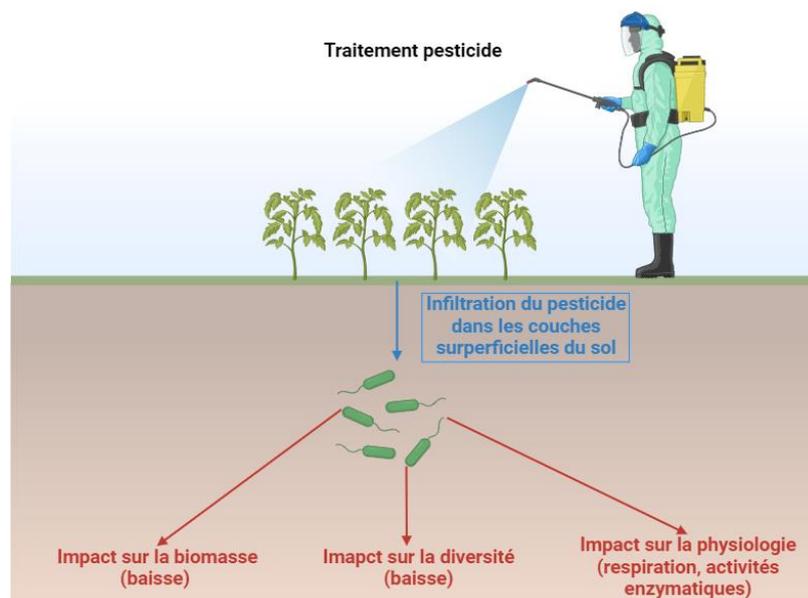


Figure 19. Schéma bilan de l'impact des pesticides sur les communautés bactériennes du sol.

D'un point de vue général, l'exposition à un pesticide entraîne une baisse de la biomasse bactérienne liée à la disparition des bactéries les plus sensibles et éventuellement à un ralentissement de la croissance dû à la présence du stresser. Cette baisse n'est en générale plus

visible quelques jours après l'exposition car les niches laissées vacantes sont progressivement colonisées par les bactéries tolérantes/résistantes. Les bactéries résistantes/tolérantes résistent au stress induit par le pesticides et utilisent les constituants libérés par les bactéries les plus sensibles pour proliférer, dans certains cas elles sont capables d'utiliser directement le pesticide comme source de nutriment et d'énergie (on parle alors de bactéries dégradantes) (Das *et al.*, 1995; Das and Mukherjee, 1998; Das and Mukherjee, 2000a; Das and Mukherjee, 2000b; Cycon and Piotrowska-seget, 2007; Baboo *et al.*, 2013; Walia *et al.*, 2014; Filimon *et al.*, 2015; Shahid and Khan, 2022).

En termes de structure des communautés, on constate en général une baisse de la diversité consécutivement à l'exposition aux pesticides. Cette baisse s'explique par la disparition des bactéries les plus sensibles. Les groupes bactériens impactés peuvent différer en fonction du (des) pesticide(s) présent(s) (Das *et al.*, 1995; Das and Mukherjee, 1998; Das and Mukherjee, 2000a; Das and Mukherjee, 2000b; Cycoń and Piotrowska-Seget, 2009; Baboo *et al.*, 2013; Walia *et al.*, 2014; Filimon *et al.*, 2015; Borowik *et al.*, 2017; Shahid and Khan, 2022).

Pour évaluer l'impact des pesticides sur la physiologie des bactéries du sol il est possible d'utiliser différentes approches. Les deux principales sont la mesure de la respiration (capacité des bactéries hétérotrophes à convertir de la matière organique ce qui aboutit à la production de dioxyde de carbone) et la mesure d'activités enzymatiques clés (carboxylestérase, uréase, déshydrogénase, phosphatase, β -glucosidase, protéase, ...). L'impact des pesticides sur ces deux paramètres est très dépendant du type de sol et du pesticide utilisé (Cycon *et al.*, 2005; Cycon and Piotrowska-seget, 2007; Cycoń and Piotrowska-Seget, 2009; Baboo *et al.*, 2013; Walia *et al.*, 2014; Filimon *et al.*, 2015; Borowik *et al.*, 2017; Shahid and Khan, 2022).

III. Comment évaluer l'impact des composés toxiques sur les organismes ?

Dans cette troisième partie nous allons dans un premier temps nous intéresser à l'étude de l'impact des composés toxiques sur les organismes au travers d'une introduction aux concepts essentiels des domaines de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie. Nous aborderons ensuite des méthodes et descripteurs classiquement utilisés ainsi que des limites des approches (éco)toxicologiques classiques qui ont conduit au développement de la toxicogénomique, de l'écotoxicogénomique et de l'approche biomarqueur de la toxicité.

En revanche, aucun développement autour de la notion mécanistique (détermination du mode d'action des xénobiotiques, étroitement lié à l'implémentation des approches de biologie moléculaire dans les années 1990) ou de la caractérisation des propriétés physico-chimiques ne seront proposées bien qu'essentielles au développement des modèles en toxicologie.

A. La toxicologie de l'environnement et l'écotoxicologie :

1. Introduction :

a. Définitions :

La toxicologie se définit comme l'étude des composés toxiques et de leurs effets sur les organismes et repose sur trois fondamentaux : la caractérisation des composés toxiques, la compréhension fines des effets issus d'une exposition à ces composés (de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme entier) et l'évaluation du risque associé à ces composés (Chapman, 2002; Hamadeh *et al.*, 2002; Waters and Fostel, 2004; Ramade, 2007c). Initialement la toxicologie est associée aux Hommes et aux animaux que l'Homme a domestiqués mais aujourd'hui cette discipline s'est étendue à toutes les formes de vie. On peut alors distinguer la toxicologie clinique (liée à la médecine humaine et vétérinaire) et la toxicologie environnementale (liée aux organismes n'entrant pas dans le domaine de la médecine humaine ou vétérinaire).

A la fin des années 1970, l'impact que pouvaient avoir les activités humaines sur l'environnement est devenu une préoccupation majeure à la fois pour les institutions, le grand public et la communauté scientifique. Un nouveau domaine a alors émergé : l'écotoxicologie. C'est une discipline voisine de la toxicologie environnementale qui possède des questionnements propres. On peut alors définir l'écotoxicologie comme la science qui étudie le devenir des polluants dans l'environnement et leurs effets ainsi que le risque lié à la dispersion de ces polluants à grande échelle (Chapman, 2002; Van Straalen, 2003; Ramade, 2007a; Duffus *et al.*, 2009d; Sánchez-Bayo, 2011a). La distinction avec la toxicologie environnementale se fait essentiellement par le biais de l'échelle d'analyse et dans les questionnements développés (**Figure 20**) (Ramade, 2007a).

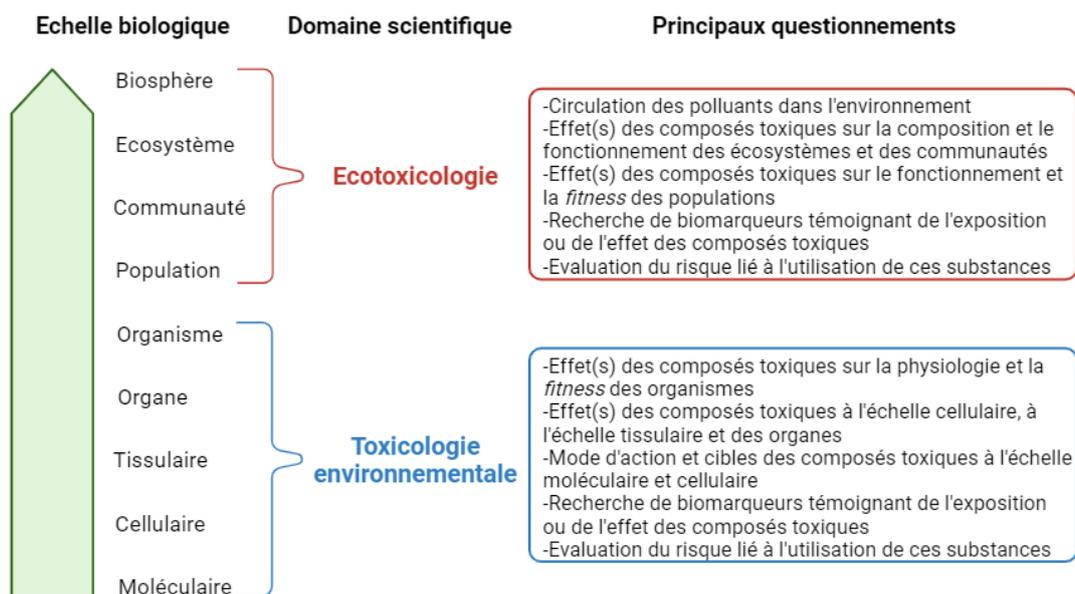


Figure 20. Schéma récapitulatif de la distinction entre les domaines de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie (inspiré de Ramade 2007c).

Dans les quatre paragraphes suivants vont être introduits des concepts fondamentaux dans les études toxicologiques et écotoxicologiques : les notions de dose et concentration, d'aiguë et chronique, de bioaccessibilité et de biodisponibilité, et de persistance.

b. Notions de dose et de concentration :

En toxicologie, il est important de faire la distinction entre deux notions proches et parfois confondues : la notion de dose et celle de concentration. La dose se définit simplement comme : « La quantité totale d'une substance prise ou absorbée par un organisme, un organe ou un tissu ». A l'inverse la notion de concentration fait référence à la quantité de substance à laquelle un organisme, un organe ou un tissu est exposé. D'une manière simple, on peut dire que la dose fait référence à la quantité de substance à l'intérieur de la composante biotique et que la concentration fait référence à la quantité de substance dans l'environnement proche de l'organisme, l'organe ou le tissu étudié (Duffus *et al.*, 2009a).

c. Les concepts aigu et chronique :

En toxicologie, les termes aigu et chronique peuvent être associés à trois notions : l'exposition, la toxicité et l'effet (Duffus *et al.*, 2009a).

Le terme aigu fait référence à des processus dont le temps de mise en place est très court : une exposition aiguë reflète une exposition unique ou une exposition qui a lieu sur un temps très court (inférieure à 24h en général); un effet aigu, est quant à lui, un effet qui apparaît rapidement après l'exposition (en général dans une période comprise entre 24h et 14 jours). Un effet aigu est en général associé à un (ou des) effet(s) délétère(s) majeur(s), la létalité (capacité d'un produit à tuer les organismes) étant le paramètre le plus suivi dans les études de toxicologie aiguë. La toxicité aiguë caractérise donc la capacité d'un composé à engendrer une forte mortalité ou des troubles physiologiques graves suite à une exposition aiguë (Ramade, 2007c; Duffus *et al.*, 2009a).

A l'inverse, la notion de chronique fait référence à des processus dont la mise en place est longue voire très longue à l'échelle de la vie de l'organisme : une exposition chronique fait référence à une exposition continue ou épisodique sur un temps long; un effet chronique, quant à lui, est un effet dont le déclenchement est très lent et en général persistant dans le temps (parfois plusieurs années voire dizaines d'années après l'exposition initiale). Ainsi, la notion de toxicité chronique caractérise la capacité d'un composé à engendrer un ou des effet(s) chronique(s) suite à une exposition chronique. Il est à noter que certains auteurs font une distinction entre exposition chronique (exposition épisodique sur un temps long) et exposition subaiguë ou subchronique (exposition continue sur un temps long) (Ramade, 2007c; Duffus *et al.*, 2009a).

Dans le cas d'une exposition aiguë il est plus facile de mettre en lien l'effet observé et l'exposition au produit (lien de cause à effet). En revanche, dans la plupart des cas il est plus difficile voire impossible de mettre en avant le lien de cause à effet entre exposition chronique et effet observé (Duffus *et al.*, 2009a).

d. Les notions de bioaccessibilité et de biodisponibilité :

Le premier concept clé dans la compréhension de l'impact des composés chimiques sur la composante biotique de l'environnement implique les notions d'accessibilité et de disponibilité des polluants. En effet, ce n'est pas parce qu'une substance est libérée dans l'environnement que celle-ci aura un effet négatif sur les organismes. Pour qu'un composé puisse induire un effet il faut, dans un premier temps, qu'il soit physiquement accessible pour les organismes : on parle alors de bioaccessibilité. Une substance est alors dite bioaccessible si et seulement si elle peut entrer en contact et interagir avec les organismes. La bioaccessibilité est fortement influencée par les facteurs environnementaux, qu'ils soient physiques ou

chimiques. Néanmoins, un composé bioaccessible n'est pas nécessairement biodisponible. Un composé est dit biodisponible lorsqu'il peut être prélevé dans l'environnement par les organismes (internalisation) et assimilé. Ce paramètre est fortement influencé par les facteurs biologiques (physiologie, propriétés moléculaires, ...) et chimiques (liés au polluant, spéciation chimique notamment). Trois cas de figure peuvent être mis en avant (Duffus *et al.*, 2009b) :

- Un composé qui n'est pas bioaccessible n'est pas biodisponible : une substance qui n'est pas physiquement accessible ne pourra pas être assimilée par les organismes (c'est par exemple le cas des polluants piégés dans les particules de matière organique);
- Un composé qui est bioaccessible n'est pas biodisponible : une substance physiquement accessible ne sera pas assimilée car elle ne franchit pas les membranes biologiques (on distingue deux moyens pour franchir les membranes biologiques : la voie passive par diffusion le long d'un gradient électrochimique et la voie active nécessitant des transporteurs). Si la substance a une taille trop importante, elle ne peut pas franchir les membranes par voie passive, l'organisme ne possède pas les transporteurs nécessaires à l'internalisation de la substance;
- Un composé qui est bioaccessible est biodisponible : une substance physiquement accessible est assimilée car elle est suffisamment petite pour traverser les membranes par voie passive ou l'organisme possède les transporteurs nécessaires à l'import de la substance dans le milieu intracellulaire.

La bioaccessibilité et la biodisponibilité sont donc des facteurs limitant la toxicité des polluants dans l'environnement (Duffus *et al.*, 2009b).

e. La notion de persistance :

Le second concept clé dans la compréhension de l'impact des composés chimiques sur la composante biotique de l'environnement implique la notion de persistance des polluants. La persistance est définie comme la capacité d'un composé à rester dans l'environnement pendant une longue période sans être transformé (par voie physique, chimique ou biologique) (Duffus *et al.*, 2009d; Sánchez-Bayo, 2011b). Une substance biodisponible a un effet d'autant plus marqué sur les organismes qu'elle persiste dans l'environnement.

L'environnement peut être représenté sous la forme d'une mosaïque de milieux interconnectés les uns avec les autres. Le temps de résidence correspond au temps qu'un composé passe dans un milieu donné. Le temps de résidence est influencé par les propriétés

physico-chimiques du milieu considéré. Le temps de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que la concentration initiale en polluant soit divisée par deux. La persistance d'un polluant est étroitement liée à ces deux paramètres (Duffus *et al.*, 2009c, 2009d; Sánchez-Bayo, 2011b).

2. Courbe dose-réponse et descripteurs classiques :

Paracelsus (de son vrai nom Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim) est un médecin, physicien et biologiste de la Renaissance (1493-1541), encore considéré aujourd'hui comme le père de la toxicologie moderne. Ses travaux sur l'utilisation des composés inorganiques (mercure notamment) dans le traitement des maladies l'ont conduit au développement de la théorie de la dose seuil. Dans son livre publié à titre posthume en 1564 intitulé *The Third Defense* on peut lire « *What is there that is not poison? All things are poison and nothing is without poison. Solely the dose determines that a thing is not a poison* » (« Qu'est-ce qui n'est pas un poison? Tout est poison et rien n'est sans poison. Seule la dose détermine qu'une chose n'est pas un poison ») (Borzelleca, 2000; Sánchez-Bayo, 2011a; Grandjean, 2016; Martins *et al.*, 2019).

En se basant sur cette théorie, les toxicologues ont développé diverses approches dont une encore très utilisée aujourd'hui : la courbe dose-réponse (**Figure 21**). Le terme dose-réponse est classiquement utilisé en (éco)toxicologie mais il faut prendre en compte le contexte puisque le terme dose peut être considéré ici comme un « synonyme » du terme concentration (on ne parle jamais de courbe concentration-réponse bien que dans de nombreux cas de figure on utilise la concentration et non la dose pour générer ces courbes). La réalisation de cette courbe est basée sur l'exposition d'un organisme à des concentrations croissantes de xénobiotique et sur la mesure d'un effet observé (ou point final mesuré). L'effet observé peut être de différente nature, que ce soit la létalité ou des modifications de différents paramètres sublétaux (prise alimentaire, activité enzymatique, taux de croissance, ...). Cette approche permet d'avoir un aperçu de l'effet du xénobiotique sur le paramètre mesuré. La courbe dose-réponse traditionnelle est représentée sous la forme d'une sigmoïde avec une phase de latence initiale pour laquelle aucun effet n'est observé (notion de seuil de toxicité), une phase exponentielle pour laquelle il y a une relation entre l'augmentation de la concentration et l'augmentation de l'effet mesuré, et une phase plateau finale correspondant à la saturation du système (l'effet maximal est atteint ; augmenter la concentration ne changera plus la valeur de l'effet mesuré) (Sánchez-Bayo, 2011a) (**Figure 21**).

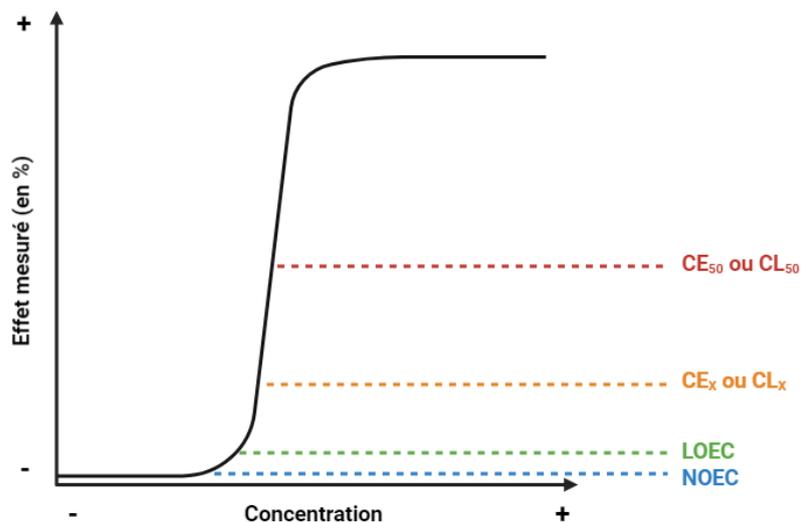


Figure 21. Courbe dose-réponse monotone et descripteurs classiques en (éco)toxicologie. NOEC : *No Observed Effect Concentration* ; LOEC : *Lowest Observed Effect Concentration* ; CE : Concentration Efficace ; CL : Concentration Létale. L'indice 50 correspond à une modification de 50% de l'effet mesuré ; l'indice x correspond à une variation de x% de l'effet mesuré.

Outre leur intérêt descriptif, les courbes dose-réponse permettent de déterminer différents descripteurs classiques utilisés en toxicologie et en écotoxicologie. Le premier descripteur est la dose létale 50% (DL_{50}) ou concentration létale 50% (CL_{50}) (**Figure 21**). Elle correspond à la dose (ou la concentration) qui induit une réduction de 50% de la population étudiée. Les DL_{50} et CL_{50} sont déterminées à partir de la phase exponentielle de la courbe. Bien que la létalité ne soit pas le paramètre le plus intéressant à mesurer (témoigne d'une toxicité aiguë), les CL_{50} et les DL_{50} sont des données très utilisées dans les aspects législatifs sur l'utilisation, la commercialisation et la gestion des produits chimiques. A partir de la phase de latence initiale, deux paramètres peuvent être déterminés : la NOEC (*No Observed Effect Concentration*, concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observé) et la LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*, ou concentration minimale pour laquelle un effet est observé) (**Figure 21**). Ces deux notions mettent en exergue la notion de seuil de toxicité mise en évidence par Paracelsus. La NOEC a été utilisée pendant longtemps pour déterminer les seuils de toxicité (elle était divisée par un facteur de risque donnant ainsi une concentration d'exposition maximale sans risque). Cependant, la détermination de la NOEC (et de la LOEC) est un processus complexe donnant des résultats très variables. Dans les aspects réglementaires actuels, les doses et concentrations de référence sont déterminées non plus à partir de la NOEC mais à partir des doses efficaces (DE) et concentrations efficaces (CE). Les DE et CE sont des doses et concentrations pour lesquelles une variation d'effet est observée (par exemple la CE_{10} est la concentration en xénobiotique nécessaire pour faire varier le paramètre mesuré de 10%). Actuellement, ce sont les CE et les DE comprises entre 5 et 10% qui sont utilisées pour

déterminer les doses et concentrations réglementaires (elles sont également divisées par un facteur d'incertitude permettant d'atteindre une dose ou une concentration d'exposition sans effet toxique) (**Figure 21**) (Chapman, 1995; Koren and Bisesi, 1996; Ramade, 2007d; Duffus *et al.*, 2009c; Sánchez-Bayo, 2011a).

3. La modélisation en (éco)toxicologie :

La courbe dose-réponse est un outil essentiel en toxicologie mais n'apporte aucune information sur les interactions entre un xénobiotique et l'organisme exposé et sur l'évolution de ces interactions au cours du temps. Il y a deux manières de visualiser les interactions entre le xénobiotique et l'organisme : l'effet du xénobiotique sur l'organisme, et réciproquement l'effet de l'organisme sur le xénobiotique. Ces deux questions ont donné respectivement naissance aux modèles de toxicodynamique et de toxicocinétique (Rozman and Doull, 2000).

De même, l'approche dose-réponse ne permet pas de prédire le risque lié à l'utilisation d'un composé chimique en se basant sur des données physico-chimiques. On fait alors référence au développement des modèles SAR (*Structure Activity Relationship*, relation structure activité) et QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*, relation structure activité quantitative).

a. Toxicocinétique :

La toxicocinétique se caractérise par la modélisation du devenir du xénobiotique dans l'organisme. Elle repose sur quatre paramètres correspondant aux différentes étapes du cycle de vie du xénobiotique : son absorption par l'organisme (comment le xénobiotique pénètre dans l'organisme, permet de faire la différence entre la concentration d'exposition et la dose interne), sa distribution dans l'organisme (comment se déplace le xénobiotique dans l'organisme, à quelle vitesse, quelle quantité atteint le site cible), sa métabolisation (comment est biodégradé le xénobiotique dans l'organisme, dans quel tissu, à quelle vitesse, quels sont les métabolites produits) et son excrétion (comment est éliminé le xénobiotique, en combien de temps, à quelle concentration, sous quelle forme) (**Figure 22**). Cette approche nécessite de connaître très finement les propriétés physico-chimiques du xénobiotique étudié car elles influencent grandement les étapes du cycle de vie de la molécule. Ce suivi du devenir du produit dans l'organisme doit dans un premier temps être réalisé expérimentalement en utilisant notamment des composés marqués (au carbone 13 notamment) avant de pouvoir intégrer ces données dans des modèles mathématiques/statistiques. Si ces modèles sont suffisamment riches en données

(expériences réalisées sur différents organismes modèles à différentes concentrations d'exposition), alors il est possible de transposer ces informations sur un nouvel organisme modèle sans avoir besoin de repasser par une étape expérimentale : on parle alors de modèles toxicocinétiques prédictifs (Koren and Bisesi, 1996; Rozman and Doull, 2000; Ashauer and Brown, 2008; Duffus *et al.*, 2009c; Grech *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2019).

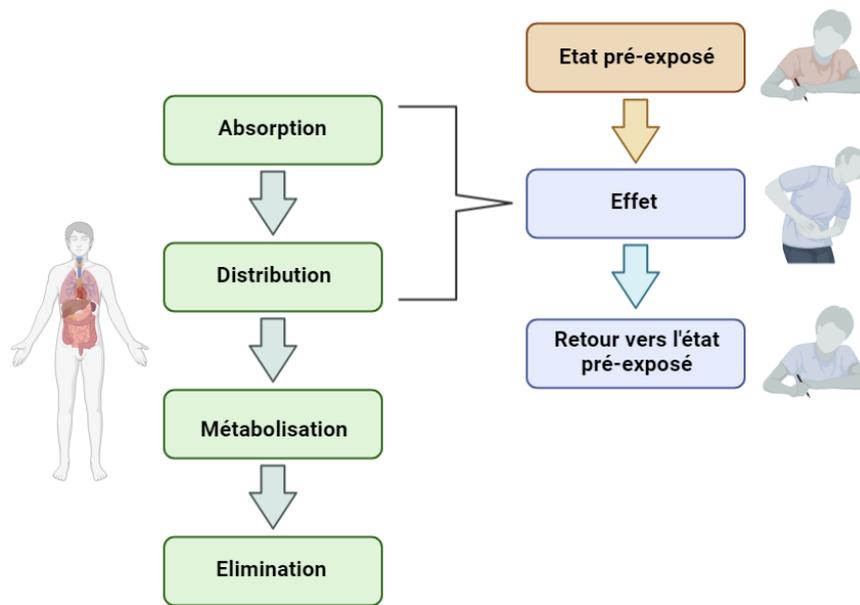


Figure 22. Schéma bilan des approches toxicocinétique et toxicodynamique. En verts sont présentés les différents processus au centre de l'approche toxicocinétique (de l'absorption du xénobiotique jusqu'à son élimination de l'organisme) permettant de répondre à la question de l'impact de l'organisme sur le xénobiotique. En bleus sont présentés les différents processus au centre de l'approche toxicodynamique permettant de répondre à la question de l'effet du xénobiotique sur l'organisme exposé.

b. Toxicodynamique :

La toxicodynamique se caractérise par la modélisation de l'effet induit par un xénobiotique chez l'organisme exposé. L'approche est basée sur l'étude des mécanismes mis en place entre l'exposition et le déclenchement de l'effet et entre le déclenchement de l'effet et le retour à l'état normal du système (**Figure 22**). Les modèles toxicodynamiques sont essentiellement basés sur trois processus : la capacité à mettre en place un système de réparation (quel système et en combien de temps), la réversibilité de l'interaction entre le xénobiotique et son site cible (réversible ou permanent, durée de l'interaction) et sur la capacité de l'organisme à revenir vers son état initial (combien de temps). Cette approche nécessite de connaître très finement la mécanistique moléculaire de l'interaction entre le xénobiotique et son site cible. Des expérimentations suffisamment développées doivent être réalisées afin de pouvoir transposer les données obtenues à un autre organisme *via* le développement de modèles

mathématiques/statistiques prédictifs (Koren and Bisesi, 1996; Rozman and Doull, 2000; Ashauer and Brown, 2008; Grech *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2019).

c. Les modèles SAR et QSAR :

Les méthodologies SAR et QSAR sont des approches de modélisation statistiques basées sur la structure chimique des xénobiotiques et sur l'hypothèse que deux composés ayant une structure chimique voisine se comportent de la même façon. L'objectif est de prédire l'impact d'un nouveau composé en se basant sur des données préexistantes pour une molécule de structure chimique voisine. Ces deux approches permettent de prédire si un composé donné engendre des effets néfastes (modèle SAR) et de déterminer à partir de quel seuil ces effets apparaissent (modèle QSAR). Ces approches ont notamment été développées pour limiter l'usage des animaux dans les tests de toxicité réglementaire. Cependant, l'utilisation de ces modèles nécessite de connaître très finement les propriétés physico-chimiques du composé étudié et de posséder une grande quantité de données sur des composés de structure chimique proche ce qui n'est pas toujours le cas. La transition vers l'utilisation massive de ces modèles *in silico* en remplacement des modèles animaux n'est donc pas possible dans un futur proche (McKinney *et al.*, 2000; Duffus *et al.*, 2009a; Schafer *et al.*, 2011; Grech *et al.*, 2016).

4. Le XXI^{ème} siècle, un tournant dans l'étude des composés toxiques :

Le XXI^{ème} siècle a marqué un tournant dans l'étude des composés toxiques et de leurs impacts sur les organismes. Les approches d'exposition aiguë à forte dose à un composé unique sur un organisme modèle dont la pertinence écologique est limitée, utilisées jusqu'alors, ont été remises en question. Désormais, on se tourne plutôt vers des approches plus cohérentes vis-à-vis des situations rencontrées dans l'environnement (exposition chronique à faible dose, si possible sur un mélange de composés et sur des organismes écologiquement pertinents). La notion même de toxicité a été remise en question, puisque souvent associée à quelque chose de délétère. Les notions d'effet et de stress ont alors émergées.

Le début du XXI^{ème} siècle a également été marqué par le développement et l'optimisation des approches de biologie haut-débit (« omique »). Ces approches se sont rapidement faites une place dans le domaine de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie et ont abouti à l'émergence de deux nouveaux domaines : la toxicogénomique et l'écotoxicogénomique.

a. Les courbes dose-réponse non-monotones et la notion de faible dose :

Le concept de faible dose a émergé au début des années 2000 et a pris une place importante en toxicologie bien qu'il soit difficile à définir. Vandenberg et collaborateurs (Vandenberg *et al.*, 2012) proposent plusieurs définitions en lien avec la fonction endocrine et sa perturbation. En revanche aucune définition exacte n'est disponible pour ce concept en toxicologie environnementale ou en écotoxicologie. En effet, la notion de faible dose peut être assimilée à une dose qui induit un faible effet (une CE₅ ou une CE₁₀ par exemple), à une exposition à dose environnementale ou encore à une exposition à une dose qui n'induit pas d'effet (donc inférieure ou égale à la NOEC). Le concept de faible dose est associé à la notion d'effet à faible dose, dans de nombreux cas de figure les effets toxiques observés étant différents entre une exposition à faible dose et à forte dose. Déterminer les effets toxiques liés aux faibles doses est alors devenu un enjeu pour comprendre l'impact de l'exposition chronique des populations à des composés chimiques (Vandenberg *et al.*, 2012).

En parallèle, le concept de courbe dose-réponse non-monotone (ou NMDRC, *Non-Monotonic Dose-Response Curve*), plutôt bien connu par les endocrinologues a pris de l'ampleur en (éco)toxicologie. Une NMDRC est définie mathématiquement comme une courbe dont la pente n'est pas monotone et change de signe en passant du positif au négatif et *vice versa* (par analogie, une courbe dont la pente augmente positivement ou décroît négativement est dite monotone, comme par exemple une courbe dose-réponse sigmoïdale classique). C'est le cas, par exemple, des courbes formant une parabole, une parabole inversée ou des courbes polyphasiques (**Figure 23**) (Vandenberg *et al.*, 2012). L'exemple de NMDRC la plus connue est la parabole (courbe en U) qui relie la survie d'un organisme en fonction de concentrations croissantes en micronutriments. A faible dose, il y a un effet très marqué sur la survie puisque les micronutriments sont essentiels au développement et donc à la survie des organismes. Puis l'effet décroît avec l'augmentation de la concentration jusqu'à atteindre une phase plateau où la concentration en micronutriments est optimale pour le développement et la survie. Cependant, si la concentration en micronutriments augmente trop, des effets toxiques apparaissent (Sánchez-Bayo, 2011a).

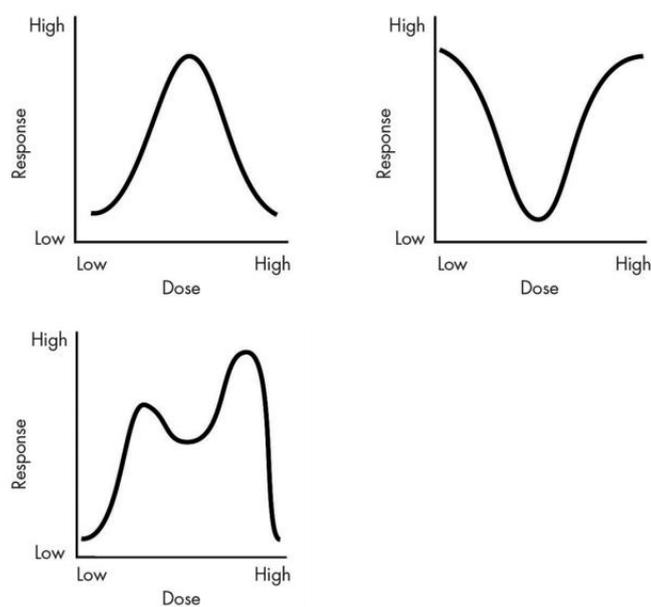


Figure 23. Exemples de courbes dose-réponse non-monotones (figure extraite de Vandenberg *et al.*, 2012).

b. La multi-exposition et la notion d'interaction :

Les approches originales de toxicologie sont largement basées sur l'exposition à une seule substance toxique (en général à forte dose) et s'inscrivent dans une démarche réglementaire et normative. Cette vision réductionniste des études de toxicité masque des situations beaucoup plus complexes, les organismes étant exposés à un mélange de contaminants dans l'environnement dont les effets sont souvent plus difficiles à mettre en évidence que de la simple mortalité par exemple (il est même quasiment impossible de faire le lien entre un effet observé et la (ou les) substance(s) à l'origine de cet effet). Pour évaluer le risque environnemental, il est donc plus pertinent de se focaliser sur des modèles de co-exposition. Mais c'est également une approche beaucoup plus complexe car il faut connaître en détails les effets de chacun des stressors (et la mécanistique associée) avant de chercher des descripteurs intéressants à analyser permettant d'évaluer la co-exposition. Dans la mesure où il existe une complexité *in situ* de par le fait que l'on ne connaisse pas la totalité des contaminants présents, les approches de modélisation (permettant d'évaluer le risque *in silico*) sont difficilement utilisables car elles ne peuvent s'appliquer que sur des mélanges dont la composition exacte est connue (Chapman, 1995; Heijne *et al.*, 2005; Ramade, 2007c; Ge *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2019).

La présence d'un mélange de contaminants dans l'environnement et la multi-exposition des organismes suggèrent que ces composés peuvent ou non interagir les uns avec les autres. S'il n'y a pas d'interaction entre deux composés on parle d'effet additif. En d'autres termes,

pour un effet mesuré il n'y a pas de différence entre l'effet mesuré dans le cas d'une co-exposition ou de la somme des effets mesurés dans le cas de simples expositions à chacun des composés (**Figure 24**). Dans le cas où des interactions existent entre les molécules (effet non-additif), trois cas de figure peuvent être observés (**Figure 24**) : (i) On parle d'antagonisme lorsque l'effet d'une substance est diminué par la présence d'une autre substance (l'effet combiné des deux substances est inférieur à l'effet isolé de l'une des deux substances); (ii) On parle de synergie lorsque l'effet observé pour une co-exposition est supérieur à la somme des effets observés dans le cas de simple exposition à chacun des composés; (iii) Enfin, on parle de potentialisation lorsque la présence d'une substance (à une concentration inférieure à la NOEC) va augmenter l'effet observé pour une autre substance (effet mesuré supérieur à celui mesuré dans le cas d'une exposition simple). En pratique il est très difficile voire impossible de faire la différence entre un effet synergique et la potentialisation (Ramade, 2007c; Duffus *et al.*, 2009a).

Il est à noter que deux substances peuvent interagir de manière additive pour un effet mesuré et interagir de manière non-additive pour un autre effet mesuré. Considérant la complexité des systèmes vivants et la grande quantité de substances existantes (et à laquelle les organismes sont exposés), la probabilité pour qu'il y ait une interaction non-additive pour un effet donné est plus importante que la probabilité d'une interaction additive (Duffus *et al.*, 2009a).

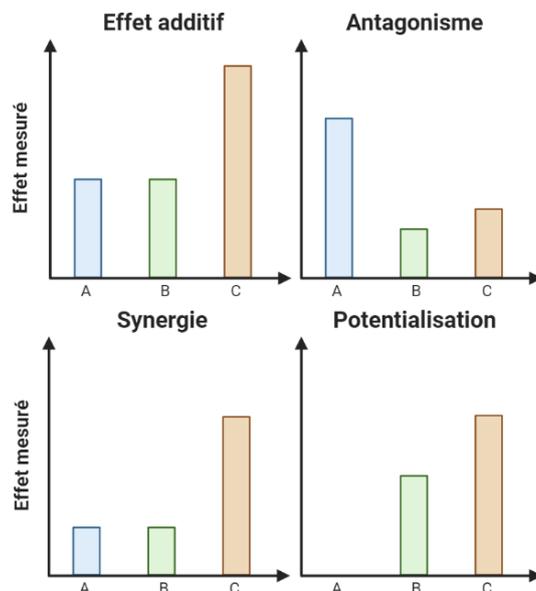


Figure 24. Schéma bilan sur la notion d'interaction. A : exposition à une substance A ; B exposition à une substance B ; C co-exposition aux substances A et B.

c. Effet et stress :

Les êtres vivants évoluent et s'adaptent aux changements de leur environnement, y compris aux changements chimiques. Les modifications mises en place constituent un effet qui peut être bénéfique, neutre ou délétère. Si la variation observée pour un effet donné est dans la fourchette de variation « normale » (adaptation à l'environnement) pour un organisme alors l'effet observé est considéré comme un effet neutre. On peut définir un effet délétère comme suit : « tout changement biochimique, morphologique, physiologique, de la croissance, du développement ou de la durée de vie d'un organisme qui entraîne une altération de la capacité fonctionnelle OU une altération de la capacité à répondre à une autre forme de stress OU une augmentation de la sensibilité » (Duffus *et al.*, 2009a). Réciproquement, un effet bénéfique peut être défini comme : « tout changement biochimique, morphologique, physiologique, de la croissance, du développement ou de la durée de vie d'un organisme qui stimule ses capacités fonctionnelles OU stimule sa capacité à répondre à une autre forme de stress OU favorise sa tolérance/résistance au stress ».

Le terme stress, très bien connu des biologistes, est une notion très complexe qui est parfois difficile à cerner (dépend notamment de la discipline et du niveau biologique auquel on se trouve). La plupart des définitions sont liées au sens physiologique du stress, mais on peut en formuler la définition suivante : « La réponse physiologique d'un organisme soumis à un stress (agent externe induisant le stress) affectant les performances et le développement de ce dernier ». Quelle que soit la définition que l'on donne à la notion de stress, on retrouve toujours deux idées communes : (i) le stress agit sur la *fitness* de l'organisme (ii) qui développe des mécanismes de réponse (adaptation) permettant de réduire l'effet ou les conséquences du stress. Dans la notion de stress environnemental, il faut prendre en compte deux types de stress : les stress biotiques (compétition, prédation, parasitisme, ...) et les stress abiotiques (température, contamination chimique, ...). Ces deux types de stress peuvent interagir entre eux de différentes façon (antagonistes, synergiques, cumulatifs, ...) (Van Straalen, 2003; Bijlsma and Loeschcke, 2005).

B. (Eco)toxicogénomique et approche biomarqueur :

1. Les sciences omiques et la (l'éco)toxicologie :

a. De la (l'éco)toxicologie à la (l'éco)toxicogénomique :

Lorsqu'un organisme est exposé à un composé toxique, il se produit une cascade d'évènements à l'échelle moléculaire dans un premier temps, qui se traduit par un effet observé à l'échelle de l'organisme entier (phénotype). Cette cascade d'évènements correspond à l'interaction entre le composé toxique et l'organisme mais également à la réponse de l'organisme suite à cette interaction. La toxicologie moléculaire est centrée sur l'étude des macromolécules biologiques impliquées dans cette cascade d'évènements. Les approches moléculaires dites « classiques » ne permettent d'avoir qu'un aperçu succinct de ce qui se passe à cette échelle puisqu'elles permettent de travailler sur un nombre réduit de gènes, protéines ou métabolites en simultané. Le développement et l'optimisation des approches de biologie moléculaire haut-débit (plus communément appelées approches « omiques ») depuis la fin des années 1990 a donné un nouveau tournant à la toxicologie moléculaire. En effet, ces approches permettent d'étudier un très grand nombre de macromolécules en simultané et donc d'avoir une vue plus globale de la réponse toxique. L'implémentation des approches « omiques » en toxicologie et en écotoxicologie a donné naissance à deux nouveaux domaines : la toxicogénomique et l'écotoxicogénomique (Decaprio, 1997; Smith, 2001; Hamadeh *et al.*, 2002; Waters and Fostel, 2004; Heijne *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2006; Boverhof and Zacharewski, 2006; Ge *et al.*, 2013; Hayward, 2014; Martins *et al.*, 2019).

b. Sciences « omiques » et méthodes d'analyse :

Les sciences « omiques » peuvent être définies comme : « Toutes les approches méthodologiques les moins restrictives possible sur le plan descriptif permettant de comprendre la complexité des systèmes vivants ». Il existe une grande diversité de sciences « omiques » mais les quatre principales (et les plus couramment utilisées en (éco)toxicogénomique), la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, sont généralement représentées sous la forme d'une cascade que l'on nomme cascade des sciences « omiques » (Figure 25).

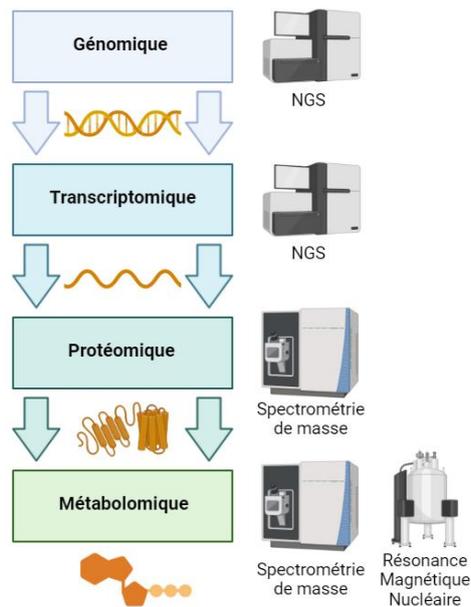


Figure 25. Sciences « omiques » et méthodes d’analyse. Pour les approches de protéomique et de métabolomique, la spectrométrie de masse et la RMN peuvent ou non être couplées avec une technique séparative (électrophorèse, chromatographie liquide ou gazeuse). NGS : *Next Generation Sequencing*.

i. La génomique :

La génomique correspond à l’analyse des séquences d’ADN, de la structure des génomes et de leur composition en gènes. Le génome contient l’ensemble de l’information génétique potentiellement exprimée (information nécessaire à la biosynthèse des protéines qui sont essentielles au fonctionnement cellulaire). Le génome est une matrice peu utilisée telle quelle par les toxicologues, à l’exclusion de ceux travaillant sur la génotoxicité des composés chimiques (une modification dans le génome induite par un composé toxique peut avoir de grandes répercussions à toutes les échelles biologiques de la cellule à la population). Les génomes sont obtenus par séquençage *via* les approches NGS (*Next Generation Sequencing*) et sont traités bioinformatiquement (**Figure 25**). C’est finalement l’annotation fonctionnelle des gènes qui est essentielle et constitue un prérequis pour le développement des approches de transcriptomique et de protéomique (Heijne *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2019).

ii. La transcriptomique :

Le transcriptome se caractérise comme l’ensemble des transcrits (ARNm) présents dans les cellules à un temps donné dans un environnement donné. Les transcriptomes sont obtenus par les approches NGS (**Figure 25**). La transcriptomique est l’étude de l’ensemble de ces

transcrits et permet de comprendre l'influence d'un composé toxique sur l'expression du génome. La transcriptomique est la première science « omique » à avoir été utilisée en toxicogénomique en 1999 (Nuwaysir *et al.*, 1999). Cependant, elle présente certaines limites. En effet, les ARNm sont des macromolécules transitoires dont la durée de vie est en générale courte (effet temps très marqué). De plus, leur étude nécessite une grande connaissance du génome (annotation) et il n'y a pas nécessairement de lien entre la présence d'un ARNm et la présence de la protéine fonctionnelle issue de la traduction de cet ARNm (les ARNm présentent essentiellement un aspect structurel et non fonctionnel). La transcriptomique est donc une approche intéressante mais qui nécessite d'être couplée à une approche « omique » fonctionnelle (protéomique ou métabolomique) pour permettre une meilleure intégration des données obtenues (Hamadeh *et al.*, 2002; Heijne *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2006; Hayward, 2014; Martyniuk and Simmons, 2016; Martins *et al.*, 2019).

iii. La protéomique :

Le protéome représente l'ensemble des protéines et peptides présents dans les cellules à un temps donné dans un environnement donné. Les protéomes sont obtenus par spectrométrie de masse avec une étape préalable de séparation par électrophorèse à deux dimensions (protéomique *in-gel*) ou en chromatographie liquide (protéomique *off-gel*) (**Figure 25**). La protéomique correspond à l'étude de l'ensemble des protéines et peptides d'une cellule et permet de comprendre l'influence d'un composé toxique sur la dynamique de synthèse des protéines. La protéomique est la seconde science « omique » à avoir été implémenté en toxicologie avec une première étude publiée en 2000 (Shepard *et al.*, 2000). Les protéines participant activement aux processus cellulaires, la protéomique permet donc d'aborder les régulations fonctionnelles de la cellule et d'étudier l'effet des stressseurs sur les processus liés aux composants protéiques (Hamadeh *et al.*, 2002; Heijne *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2006; Hayward, 2014; Martyniuk and Simmons, 2016; Martins *et al.*, 2019).

iv. La métabolomique :

Le métabolome se définit comme l'ensemble des composés de faible masse moléculaire (< 1500 Da) ou métabolites présents dans les cellules à un temps donné dans un environnement donné. Les métabolomes sont obtenus par des approches de chimie analytique : RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ou spectrométrie de masse (couplée ou non avec une

technique chromatographique liquide ou gazeuse) (**Figure 25**). La métabolomique correspond à l'étude des métabolites d'une cellule et permet d'étudier l'effet des stressseurs chimiques sur la biosynthèse des métabolites et donc sur le métabolisme d'une manière général. La métabolomique est la troisième science « omique » intégrée en toxicologie avec une première étude publiée en 2002 (Reo, 2002). Les métabolites sont les produits des réactions biochimiques (enzymatiques) et chimiques et sont donc des témoins des processus cellulaires mis en jeu et/ou perturbés. On peut considérer que la métabolomique est la science « omique » la plus proche du phénotype observé (Hamadeh *et al.*, 2002; Heijne *et al.*, 2005; Ankley *et al.*, 2006; Hayward, 2014; Martyniuk and Simmons, 2016; Martins *et al.*, 2019).

La transcriptomique, la protéomique et la métabolomique permettent de mesurer la réponse induite par un stressseur à différents niveaux d'organisation biologique. La combinaison de ces différentes approches (intégration) permet d'avoir une vision globale de l'état physiologique d'une cellule/d'un organisme après une exposition à un stressseur et de mettre en évidence les différents niveaux de réponse toxicologique, de la captation du stimulus par des senseurs jusqu'à la réponse de l'organisme. Ces approches présentent des sensibilités suffisamment importantes pour permettre de dégager une signature d'exposition ou d'effet d'un composé toxique sur l'organisme et facilitent la mise en évidence de biomarqueurs potentiels (Decaprio, 1997; Ankley *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2013; Hayward, 2014; Martins *et al.*, 2019).

2. La notion de biomarqueur :

a. Introduction :

Initialement, la notion de biomarqueur est un concept présent en biologie et médecine humaine qui permet de témoigner de la présence d'une pathologie ou d'un dysfonctionnement lié à une pathologie (Eason and O'Halloran, 2002; Forbes *et al.*, 2006). Cette notion a ensuite été transposée dans le domaine de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie. En se basant sur les définitions présentes dans la littérature, nous pouvons proposer la définition suivante : « Un biomarqueur est un paramètre biologique (biochimique, physiologique, histologique, comportemental) pouvant être mesuré objectivement, témoignant de l'exposition à un stressseur et/ou de l'effet lié à la présence du dit stressseur, et permettant de faire la distinction entre l'état de stress et l'état normal de l'organisme considéré » (Decaprio, 1997; Eason and O'Halloran, 2002; Handy *et al.*, 2003; Lam and Gray, 2003; Van der Oost *et al.*,

2003; Bailey and Ulrich, 2004; Galloway *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2004; Forbes *et al.*, 2006; Duffus *et al.*, 2009c).

Bien que possédant des avantages, les biomarqueurs doivent être utilisés en compléments des approches traditionnelles de chimie analytique (détection et quantification des composés dans les matrices environnementales). En effet, ils permettent de mettre en évidence la présence d'un contaminant biologiquement disponible (pas sous forme inerte) ou la présence de contaminants non-suspectés. De plus, un biomarqueur peut persister dans le temps après une exposition transitoire à un contaminant (même une fois que le composé ait été dégradé et donc plus détectable) (Handy *et al.*, 2003). Il faut également noter qu'il est généralement reconnu qu'un ensemble de biomarqueurs (signature) est en générale plus pertinente à utiliser (et à identifier) qu'un biomarqueur unique (Handy *et al.*, 2003; Lam and Gray, 2003; Bailey and Ulrich, 2004).

Il est possible de faire la distinction entre trois types de biomarqueurs : biomarqueur d'exposition, d'effet et de susceptibilité (Decaprio, 1997; Handy *et al.*, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003; Duffus *et al.*, 2009c).

b. Les différents types de biomarqueurs :

i. Biomarqueurs d'exposition :

Un biomarqueur d'exposition se définit comme un biomarqueur témoignant de l'entrée du composé dans un système vivant (passage à travers les membranes biologiques) ou de l'interaction entre le composé et les biomolécules du système vivant. La quantification du xénobiotique et/ou de ses métabolites dans l'organisme (mesure de la dose interne) peut être considéré comme un biomarqueur d'exposition. La production et la mesure des adduits (substance se liant à l'ADN par une liaison covalente) à l'ADN sont un des marqueurs d'exposition le plus connus aujourd'hui (Decaprio, 1997; Lam and Gray, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003; Duffus *et al.*, 2009c).

ii. Biomarqueurs d'effet :

Un biomarqueur d'effet peut être défini comme tout changement biochimique, physiologique, histologique ou comportemental témoignant d'une altération de l'organisme consécutivement à son exposition à un composé chimique. Ce type de biomarqueurs peut

permettre la mise en évidence d'effets précoces (à l'échelle moléculaire ou cellulaire notamment, c'est par exemple le cas de certaines enzymes comme l'acétylcholinestérase ou des enzymes hépatiques) ou d'altérations structurelle et fonctionnelle plus importantes (au niveau tissulaire, des organes ou de l'organisme entier; ce peut être par exemple des cas de nécrose ou le déclenchement de certaines pathologies) (Decaprio, 1997; Lam and Gray, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003; Duffus *et al.*, 2009c).

iii. Biomarqueurs de susceptibilité :

La notion de biomarqueur de susceptibilité est plus difficile à entrevoir et est souvent difficile à distinguer (en pratique) de la notion de biomarqueur d'effet. Un biomarqueur de susceptibilité est étroitement lié aux paramètres toxicocinétiques et à la capacité d'adaptation de l'organisme. On peut définir ce type de biomarqueur comme : « Un témoin de la capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à une exposition à un xénobiotique ». Les séquences d'ADN et leurs mutations peuvent être de bons biomarqueurs de susceptibilité : une modification du site cible du xénobiotique (baisse de sensibilité), la présence dans le génome de récepteurs membranaires particuliers permettant une entrée plus efficace du xénobiotique dans les cellules ou encore une mutation sur une enzyme de détoxification (ce qui a une influence sur les paramètres toxicocinétiques) (Decaprio, 1997; Van der Oost *et al.*, 2003; Duffus *et al.*, 2009c).

IV. Focus sur une nouvelle approche « omique » en toxicologie : la volatolomique :

Dans cette quatrième partie, nous allons nous focaliser sur une science « omique » qui jusqu'à lors n'était pas utilisée dans le domaine de la toxicologie environnementale ou de l'écotoxicologie : la volatolomique. Cette approche analytique est focalisée sur des composés particuliers : les Composés Organiques Volatils ou COV. Dans un premier temps nous allons en apprendre un peu plus sur ces COV et sur leurs origines, puis sera développé le concept de volatolomique et ses domaines d'application et enfin nous aborderons le rôle écologique des COV notamment par le prisme des interactions entre organismes qu'ils soient ou non du même règne.

A. Les Composés Organiques Volatils :

1. Définition et propriétés :

D'après la Directive Européenne du 11 mars 1999 (1999/13/CE), un Composé Organique Volatil (ou COV) se définit comme : « Tout composé organique (contient au minimum du carbone et de l'hydrogène) dont la pression de vapeur est de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K (soit 20°C) ou ayant une volatilité correspondante dans des conditions d'utilisation particulières » (Cicolella, 2008).

D'après la littérature, les COV sont caractérisés par cinq paramètres physico-chimiques : ce sont des composés en général liposolubles avec une masse moléculaire faible (< 300 Da), une pression de vapeur élevée (pression exercée par la phase gazeuse sur son équivalent solide ou liquide), une volatilité importante (vitesse à laquelle un composé passe sous sa forme gazeuse) et un point d'ébullition faible (température à laquelle un composé passe de son état liquide à son état gazeux). Par leurs propriétés physico-chimiques, ces composés diffusent efficacement dans les différents compartiments de l'environnement et interagissent (ou intègrent) facilement avec la biomasse (Rowan, 2011; Morath *et al.*, 2012; Audrain *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Tyc *et al.*, 2017; Netzker *et al.*, 2020; Weisskopf *et al.*, 2021).

2. Sources d'émission des COV :

Il existe une grande diversité de sources de COV. Les sources peuvent être primaire ou secondaire. On parle de source primaire lorsque les COV sont directement émis et de source secondaire lorsqu'ils subissent des transformations chimiques (oxydation et photodégradation dans l'atmosphère essentiellement) après émission. Il faut également faire la distinction entre deux types de sources primaires : les sources anthropiques (liées aux activités humaines) et les sources biogéniques (liées aux émissions naturelles) (Rocco, 2021; Dufresne, 2022).

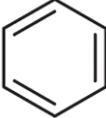
En 2007, les sources anthropiques représentaient 142 Tg/an. Elles sont issues de divers secteurs tels que les activités de transport, les activités industrielles (notamment *via* l'usage des solvants organiques) et les activités domestiques (chauffage, cuisine, solvants) (Goldstein and Galbally, 2007; Rocco, 2021; Dufresne, 2022).

Les sources biogéniques correspondent aux émissions issues du métabolisme des organismes vivants et des feux de biomasses. Les émissions issues du métabolisme proviennent

majoritairement des végétaux pour la partie aérienne (avec l'isoprène notamment). En revanche, les émissions provenant du sol et des milieux aquatiques, bien que plus minoritaires, sont dues aux microorganismes. La production de COV biogéniques issue du métabolisme est grandement influencée par les paramètres abiotiques (pH, qualité et quantité de nutriments, température, humidité, lumière, concentration en oxygène) et biotiques (l'espèce productrice, son stade de développement, son état physiologique et les interactions qu'elle entretient avec les organismes vivants à proximité) (Korpi *et al.*, 2009; Morath *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2015; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Tyc *et al.*, 2017; Weisskopf *et al.*, 2021). Les émissions biogéniques peuvent représenter jusqu'à 80-90% des émissions annuelles de COV. Elles sont donc majoritaires par rapport aux sources anthropiques, excepté dans les zones urbaines où elles deviennent minoritaires (Goldstein and Galbally, 2007; Cicoiella, 2008; Borbon *et al.*, 2013; Rocco, 2021; Dufresne, 2022).

3. Grands groupes moléculaires de COV biogéniques d'origine métabolique :

Table 3. Tableau regroupant les principales grandes familles de COV. R (suivie ou non d'un chiffre) : radical qui peut être une chaîne hydrocarbonée (plus ou moins longue) ou un cycle aromatique; X : atome de la famille des halogènes (les plus fréquemment retrouvés dans les COV sont : le fluor, chlore, le brome et l'iode); HC : hydrocarbure.

Type d'hydrocarbure	Sous-famille d'hydrocarbure	Groupe fonctionnel
HC aliphatique saturé	Alcane	$R_1-CH_2-CH_2-R_2$
HC aliphatique insaturé	Alcène	$R_1R_2-C=C-R_3R_4$
	Alcynes	$R_1-C\equiv C-R_2$
HC aromatique	Alicyclique	Forme cyclique d'un HC aliphatique
	Contient au moins un noyau aromatique de type benzène	
HC substitué	Alcool	Groupe hydroxyle $R-OH$
	Aldéhyde	Groupe carbonyle $R-C(=O)H$
	Cétone	Groupe carbonyle $R_1-C(=O)-R_2$
	Acide carboxylique	Groupe carboxyle $R-C(=O)OH$
	Ether	Groupe éther R_1-O-R_2
	Ester	Groupe ester $R_1-C(=O)O-R_2$
	Amine	Groupe amine $R-NH_2$
	Amide	Groupe amide $R-C(=O)NH_2$
	Nitrile	Groupe nitrile $R-C\equiv N$
	Halogéné	$R-X$
Soufré	R_1-S-R_2	

Les COV biogéniques d'origine métabolique sont caractérisés par une grande diversité chimique mais ce sont tous des composés hydrocarbonés. Suivant leur agencement et leur composition en atomes, ils sont classés en différentes familles chimiques. La **Table 3** présente une vue synthétique des différentes familles chimiques de COV (Cicoella, 2008; Rocco, 2021).

Les origines métaboliques des COV biogéniques ne sont pas toujours connues. Certains COV sont liés au métabolisme primaire (production d'énergie et de biomasse) et sont donc soit des intermédiaires de synthèse, soit des composés de bout de chaîne métabolique. S'ils sont issus du métabolisme secondaire, ce sont alors des composés produits par l'organisme pour se maintenir et s'adapter à des changements de paramètres biotiques ou abiotiques de son milieu. Dans cette section, nous nous limiterons aux connaissances portant sur les COV produits par les microorganismes (bactéries et champignons).

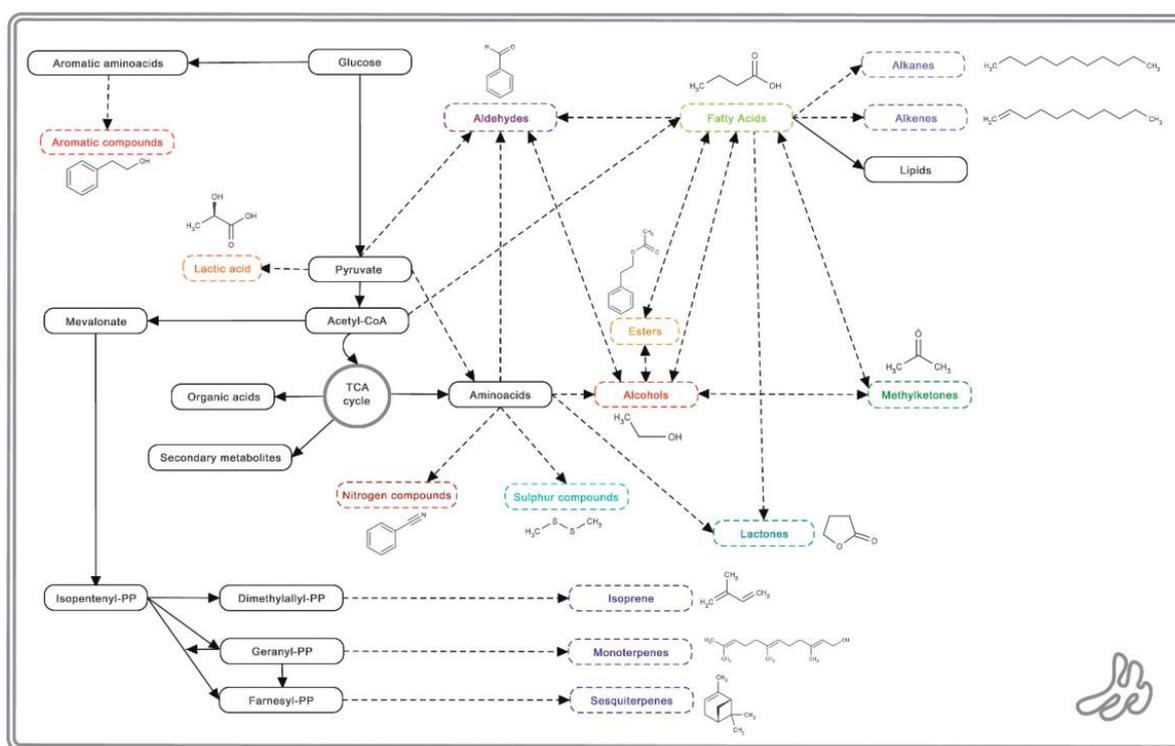


Figure 26. Représentation schématique des principales voies métaboliques conduisant à la production de COV (ici chez les bactéries mais peut être en partie généralisées). Les COV sont indiqués en couleur dans les formes ovales en pointillés accompagné d'un exemple marquant : alcool (éthanol), aldéhyde (benzaldéhyde), alcane (undécane), alcène (1-undécène), composé aromatique (2-phényléthanol), ester (2-phényléthyl-ester), acide gras volatil (acide butyrique), lactone (gamma-butyrolactone), méthylcétone (acétone), monoterpène (farnésol), sesquiterpène (pinène), composé nitré (benzonitrile) et composé sulfuré (diméthyldisulfide) (figure et légende extraites de Schmidt *et al.*, 2015).

Le métabolisme des acides gras (AG) est un grand fournisseur de COV. La décarboxylation des AG permet la production d'hydrocarbures aliphatiques (alcane, alcène) et de méthyl-cétone. La réduction des AG, quant à elle, conduit à la production d'aldéhydes et

de cétones. De nombreux COV proviennent également du métabolisme des acides aminés (aa). Ainsi, les hydrocarbures aromatiques proviennent du catabolisme des aa aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) et les composés nitrés proviennent de l'anabolisme des aa. La désamination des aa entraîne la biosynthèse d'aldéhydes, de cétones et d'alcools et les composés soufrés proviennent majoritairement du catabolisme de la méthionine. Les terpènes sont des métabolites secondaires provenant soit de la voie du mévalonate, soit de la voie du désoxyxylulose-phosphate (seul les mono- et les sesquiterpènes sont des COV). Les acides volatils (peu nombreux) proviennent essentiellement du métabolisme anaérobie des sucres (fermentation) (**Figure 26**) (Schulz and Dickschat, 2007; Bos *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2013; Audrain *et al.*, 2015; Veselova *et al.*, 2019).

B. Volatolome et volatolomique :

1. Définition :

La volatolomique se définit comme l'étude haut-débit des COV. Cette approche emprunte les principes fondamentaux développés en métabolomique (recherche d'une signature métabolique consécutive à une perturbation). Par la sélectivité des COV, la volatolomique peut être considérée comme une approche de métabolomique ciblée sur les métabolites volatils. Il est alors possible de définir la notion de volatolome comme la fraction volatile du métabolome à un instant donné dans un environnement donné (Broza *et al.*, 2015; Giannoukos *et al.*, 2019).

2. Contexte méthodologique :

L'étude des COV (comme celle des métabolites solubles) est complexe puisque le volatolome se caractérise par la libération d'un mélange de composés présents en quantité variable et aux propriétés physico-chimiques diverses. Le *workflow* développé en volatolomique est très proche de celui développé en métabolomique et est caractéristique des approches pluridisciplinaires (biologie, chimie analytique, statistique, bioinformatique). Il comporte six grandes étapes (**Figure 27**) : la détermination de la question biologique et le *design* expérimental, la préparation des échantillons, l'extraction des COV, l'analyse des COV, l'identification et la sélection des COV discriminants, l'interprétation et l'intégration biologique.

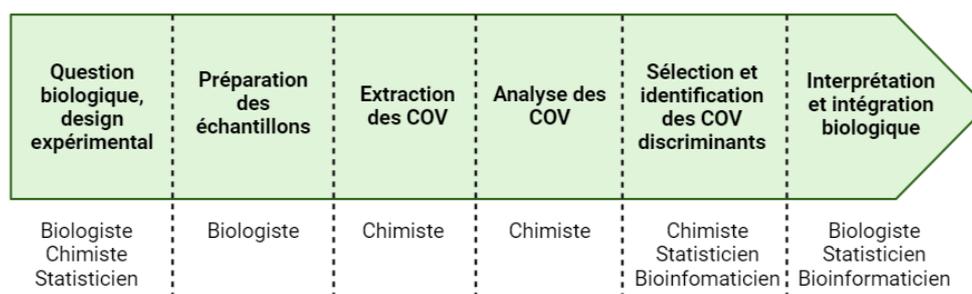


Figure 27. Le *workflow* en volatolomique.

a. Différentes méthodologies :

L'analyse des COV se fait en deux temps : une étape d'échantillonnage (ou étape d'extraction) et une étape d'analyse.

Deux méthodes d'extraction peuvent être utilisées pour récupérer les COV dans un échantillon. La première est une extraction en phase liquide basée sur l'utilisation de solvants de polarités croissantes (approche similaire à celle utilisée en métabolomique). Cette approche a l'avantage de permettre l'extraction d'une très grande diversité de composés aux propriétés physico-chimiques diverses mais englobe également l'extraction de métabolites solubles. La seconde approche ne nécessite pas de solvants et permet uniquement l'extraction des COV se trouvant à l'extérieur de l'échantillon. Il est donc en général nécessaire de lyser les cellules composant l'échantillon pour avoir accès aux COV intracellulaires. Cette extraction se fait dans l'espace de tête (ou HS, *HeadSpace*) d'un flacon (nous reviendrons sur cette étape technique dans la suite de ce manuscrit). Différentes approches sont disponibles pour prélever les COV de l'HS : la microextraction en phase solide (SPME, *Solid Phase Micro-Extraction*), le prélèvement de l'HS à l'aide d'une seringue ou le transport de l'HS jusqu'à l'outil d'analyse *via* un flux de gaz transporteur (gaz non-réactif tel que l'hélium ou le diazote) (Rowan, 2011).

L'étape d'analyse repose sur deux méthodes de chimie analytique : la spectrométrie de masse (MS, *Mass Spectrometry*) et la RMN. Plusieurs types d'approche MS peuvent être utilisés en volatolomique, les plus courantes étant la PTR-MS (*Proton Transfer Reaction-MS*), la SIFT-MS (*Selected Ion Flow Tube-MS*), l'IMS-MS (*Ion Mobility Spectrometry-MS*), la DIMS (*Direct Injection MS*) et la GC-MS (*Gas-Chromatography-MS*) (Rowan, 2011).

Dans la suite de ce manuscrit nous allons nous focaliser sur l'approche méthodologique la plus classiquement utilisée en volatolomique : l'HS-SPME-GC-MS. Qui consiste en une microextraction des COV en phase solide dans l'espace de tête (ou HS-SPME), suivie d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS).

b. L'approche classique : HS-SPME-GC-MS :

i. L'étape d'échantillonnage : HS-SPME :

L'espace de tête ou HS est défini comme l'espace compris entre la surface d'une matrice (qui peut être solide ou liquide) et le bouchon d'un flacon (**Figure 28**). Les COV étant des composés caractérisés par une grande volatilité, ils passent de la matrice à l'HS en respectant les lois de la thermodynamique, notamment la notion d'équilibre chimique entre les phases. Cette loi nous indique qu'une fois la phase d'équilibre atteinte, la concentration en COV dans l'HS est proportionnelle à la concentration en COV dans la matrice. Les COV sont donc concentrés dans l'HS ce qui facilite leur extraction sans avoir à entrer en contact direct avec la matrice (Papet *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2011; Spietelun *et al.*, 2013).

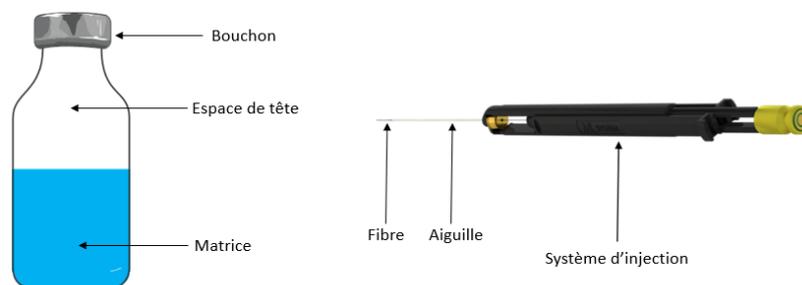


Figure 28. Représentation schématique de l'espace de tête (sur la gauche de la figure) et des constituants d'un dispositif SPME (sur la droite de la figure).

La microextraction en phase solide ou SPME est une méthode développée en 1990 par Pawliszyn et collaborateurs (Arthur and Pawliszyn, 1990). Cette méthode a rapidement pris une place importante en chimie analytique car elle est simple d'utilisation, sensible, avec un temps d'extraction généralement court, ne nécessite pas de solvant organique, peut être automatisée et peut être couplée avec des techniques chromatographiques ou électrophorétiques. Le dispositif SPME est composé de trois éléments : un système d'injection dans lequel on trouve une aiguille creuse, à l'intérieure de laquelle se trouve un piston au bout duquel se trouve une fibre (environ 1 cm de long) recouverte de polymères adsorbants (**Figure 28**). Cette approche est également basée sur la notion d'équilibre chimique entre les phases (ici trois phases : la matrice, l'HS et la fibre SPME). L'extraction des COV dans l'HS par la méthode SPME se fait en quatre temps (**Figure 29**) : la préparation de l'échantillon, l'extraction au sens strict, la phase post-extraction et la phase de désorption thermique des analytes dans le pore du chromatographe. Une fois l'échantillon préparé, il est placé dans une fiole fermée

hermétiquement. Juste avant de sceller la fiole, l'air présent est chassé à l'aide d'un flux de gaz neutre (diazote par exemple) pour limiter l'oxydation des analytes. La fibre SPME est placée dans l'HS (passage de l'aiguille à travers un *septum* en caoutchouc) pendant une période donnée (temps d'extraction). Le temps d'extraction optimal est défini comme le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre chimique entre les phases. Cependant, il est très rare d'atteindre cet état car cela nécessiterait beaucoup de temps (plusieurs heures voire dizaine d'heures). Pour maximiser l'extraction des analytes et réduire le temps d'extraction il est possible de faire varier différents paramètres comme l'agitation, la température, la concentration en sels ou le pH (favorisent la volatilité des COV et parfois des composés semi-volatils). Une fois l'extraction terminée, la fibre et l'aiguille sont remontées dans le système d'injection (phase post-extraction). L'aiguille et la fibre sont placées dans le pore du chromatographe où les composés adsorbés seront thermiquement désorbés de la fibre (augmentation progressive de la température jusqu'à 280°C) (Papet *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2011; Spietelun *et al.*, 2013).

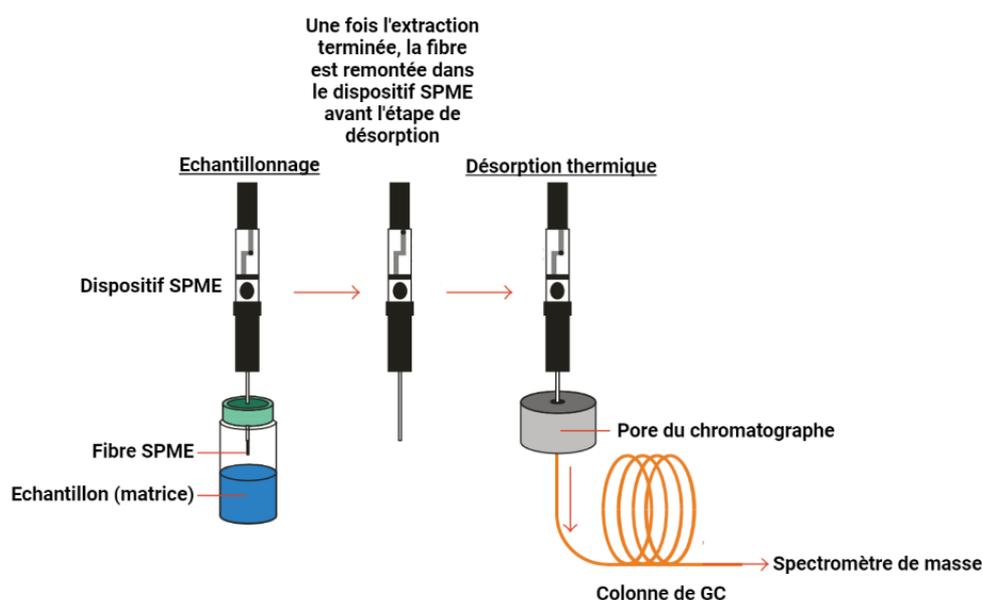


Figure 29. Processus d'extraction des COV par la méthode HS-SPME (figure modifiée d'après Schmidt and Podmore, 2015).

Cette méthode présente toutefois quelques limites. En effet, l'extraction des COV dépend du choix de la fibre utilisée qui influence les analytes préférentiellement extraits de l'HS (soit des composés polaires soit des composés apolaires). De plus, des phénomènes d'encombrement stérique peuvent se produire, ce qui conduit à une saturation de la fibre par les COV les plus gros ou les plus abondants, réduisant ainsi la représentativité des COV extraits de l'HS (Ouyang *et al.*, 2011; Spietelun *et al.*, 2013).

ii. L'étape d'analyse : la GC-MS :

L'approche GC-MS est une approche couplée permettant à la fois la séparation des analytes (GC) et leur fragmentation afin de déterminer leur masse (MS) (**Figure 30**).

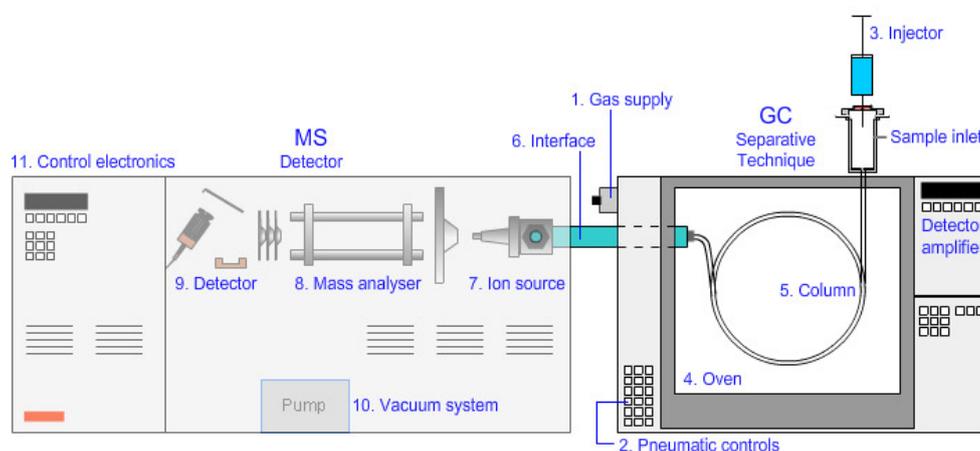


Figure 30. Exemple détaillé d'un couplage entre un chromatographe en phase gazeuse (GC) et un spectromètre de masse (MS). 1-L'alimentation en gaz inerte (hélium) permet le transport des composés dans la colonne, 2-Le module de contrôle pneumatique gère le flux et la vitesse d'injection du gaz inerte dans le chromatographe, 3-L'injecteur représente ici le dispositif SPME, les COV adsorbés sur la fibre sont thermiquement désorbés dans le pore du chromatographe, 4-La chambre chauffée dans laquelle la température est contrôlée, 5-La colonne dans laquelle est déposée une fine couche de polymères adsorbants et dans laquelle circuleront les composés à séparer, 6-L'interface permettant le passage des composés jusqu'au spectromètre (on parle parfois de ligne de transfert), 7-La source d'ionisation permet d'ioniser et de fragmenter les différents composés, 8-L'analyseur permet de séparer les fragments/composés selon leur rapport masse/charge (m/z), 9-Le détecteur permet de quantifier les ions en fonction de leur rapport m/z , 10-Le système de mise sous-vide permet d'éliminer l'oxygène au sein du spectromètre et d'empêcher toute réaction d'oxydation des fragments/composés et 11-Le système de pilotage informatique permet de contrôler l'analyse et de convertir les signaux en chromatogramme et spectre de masse (d'après Hussain and Maqbool, 2014).

La GC est une chromatographie dans laquelle la phase mobile est un gaz inerte (comme l'hélium) ou non réactif (comme l'azote) et la phase stationnaire est une fine couche de liquide ou de polymère déposée à la surface d'un solide inerte (colonne). Dans le cas de la SPME-GC, une fois les analytes désorbés thermiquement dans le pore du chromatographe, ils sont transportés dans la colonne grâce au flux de gaz transporteur et séparés selon leur polarité ou leur volatilité (en fonction de la colonne utilisée) (**Figure 30**). Une fois la colonne traversée par l'échantillon, on obtient un chromatogramme qui permet de définir un temps de rétention (temps passé dans la colonne) pour chaque composé. Cette valeur pourra être corrigée par l'utilisation d'une solution de calibration externe (mélange d'alcane par exemple) donnant ainsi l'indice de rétention des composés dans la colonne. Pour une meilleure résolution chromatographique, la GC peut être réalisée en tandem (GC-GC) avec une première séparation

selon la polarité et une seconde selon la volatilité. C'est une méthode qui s'applique en priorité aux composés volatils (ou semi-volatils) thermostables bien que la séparation de composés solubles thermolabiles soit possible si une étape de dérivation (modification de la structure chimique) est réalisée en amont de la séparation (Dunn and Ellis, 2005; Wang and Griffiths, 2007; Jousse and Pujos-Guillot, 2013; Hussain and Maqbool, 2014).

Les composés séparés sont ensuite transmis au spectromètre de masse. Ce dernier est composé de quatre éléments : une source d'ionisation, un analyseur, un détecteur et un système de pilotage informatique (**Figure 30**). Les analytes de l'échantillon sont, dans un premier temps ionisés au niveau de la source d'ionisation. Il est possible de faire la distinction entre deux types d'ionisation : l'ionisation électronique (IE, ou ionisation dure) et l'ionisation chimique (IC, ou ionisation douce). La GC étant centrée sur l'analyse des composés volatils de faible masse moléculaire, l'IE est privilégié. L'IE consiste à projeter des électrons de haute énergie dans le gaz contenant les analytes pour former des ions. Ces ions étant instables, ils se décomposent en fragments plus stables. Le spectre de masse obtenu est alors constitué de fragments des molécules mères présentent dans l'échantillon de départ ce qui apporte des informations structurales sur les molécules mais ne donnera pas accès aux pics moléculaires (permettant de déterminer la masse exacte des composés) obtenu dans le cas d'une IC. Une fois sous forme ionique, les composés sont séparés selon leur ratio masse/charge (m/z) au niveau de l'analyseur et seront détectés par le détecteur qui permet de les quantifier en fonction de leur rapport m/z . Les données du détecteur sont transférées au système informatique qui convertit le signal électrique en spectre de masse (abondance des ions en fonction du ratio m/z). Pour maximiser les informations provenant de la spectrométrie de masse, il est possible de faire de la MS en tandem (MS-MS) avec une première analyse basée sur une IC puis passage dans une chambre de collision pour une seconde analyse basée sur une IE (Dunn and Ellis, 2005; Wang and Griffiths, 2007; Jousse and Pujos-Guillot, 2013; Hussain and Maqbool, 2014).

iii. Analyse des données :

Les composés analysés par GC-MS sont caractérisés par un temps/indice de rétention, un profil de masse et une intensité de signal. Ces informations, sont comparées à des données contenues dans des bases de données comme celle du NIST (*National Institute of Standards and Technology*, <https://www.nist.gov/>) afin d'identifier les composés correspondant (Dunn and Ellis, 2005; Babushok *et al.*, 2007; Jousse and Pujos-Guillot, 2013; Hidalgo *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2023).

Le traitement statistique des données d'intensité de signal (ou de quantification si une approche quantitative a été développée) permet de sélectionner des composés discriminants (approche univariées type ANOVA, *Analysis Of Variance*) et de participer au développement de modèles (analyse multivariée type ACP, Analyse en Composante Principale, ou PLS, *Partial Least Square*) (Heijne *et al.*, 2005; Rowan, 2011; Bouhifd *et al.*, 2013; Hidalgo *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2023).

L'interprétation et l'intégration biologique des données obtenues ne peut se faire que grâce à la comparaison avec des bases de données spécialisées comme KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <https://www.genome.jp/kegg/>), une revue de la littérature existante et éventuellement par le développement d'expériences complémentaires (Bouhifd *et al.*, 2013; Kanehisa *et al.*, 2016).

3. La volatolomique et l'étude du vivant :

a. La qualité et la sécurité alimentaire :

Il est connu que les microorganismes ont la capacité de coloniser les matrices alimentaires et de les altérer. Les altérations visuelles, odorantes ou matricielles conduisent en général à la non-consommation de l'aliment concerné. Mais dans certains cas de figure, l'altération n'est pas visible et représente un risque important pour la santé humaine et animale, que ce soit par l'ingestion de microorganismes pathogènes (cas de *Listeria monocytogenes* par exemple) ou de toxines produites par ces derniers (cas de *Clostridium botulinum* par exemple). Dans ce cas, l'utilisation de la signature volatile d'un aliment permettrait de pouvoir mettre en évidence sa potentielle colonisation par des microorganismes ou son altération (Korpi *et al.*, 2009; Rowan, 2011; Sohrbi *et al.*, 2014).

De même, l'altération chimique des aliments, après contact direct de l'aliment avec un composé toxique ou indirectement *via* l'alimentation des animaux d'élevage par exemple a pu être révélée par l'approche volatolomique (Ratel and Engel, 2009; Berge *et al.*, 2011; Bouhlel *et al.*, 2017; Ratel *et al.*, 2017, 2022).

b. Le diagnostic pathologique :

La détection des COV est également utilisée dans le domaine de la médecine humaine avec la mise en évidence de biomarqueurs témoignant de certaines pathologies.

Dans le cas des pathologies infectieuses d'origine bactérienne la mise en place d'un traitement antibiotique adapté est la clé pour garantir un meilleur rétablissement des patients voire leur survie. La mise en place de ce traitement nécessite l'identification précise de la bactérie mise en cause, traditionnellement par des approches culturale et biochimique puis par des approches moléculaires (ADNr 16S, spectrométrie de masse) mais ces approches sont soit coûteuses soit chronophages. La recherche de nouveaux biomarqueurs de diagnostic a conduit les chercheurs à s'intéresser aux COV émis par les bactéries pathogènes. Il a été montré qu'il est possible d'identifier les bactéries pathogènes en fonctions de leur profil volatil. Cependant, les études sur les marqueurs volatils bactériens en clinique sont toujours au stade des études *in vitro* (Thorn *et al.*, 2011; Bean *et al.*, 2012; Dolch *et al.*, 2012a, 2012b; Jünger *et al.*, 2012; Sethi *et al.*, 2013b; Boots *et al.*, 2014; Sohrbi *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017).

Le traitement efficace des maladies est en particulier lié à la rapidité de diagnostic. Les COV peuvent être utilisés comme marqueurs pour le diagnostic de pathologies non-infectieuses tels que les cancers (poumon, foie, sein, prostate, colon, ...), les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson), des désordres métaboliques (diabète, hyperglycémie, ...), l'asthme, la schizophrénie, ... La preuve de concept est largement publiée mais l'utilisation des COV en tant que marqueurs de ces pathologies est encore peu systématique en diagnostic clinique (Probert *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2010; Hakim *et al.*, 2012; Broza and Haick, 2013; Broza *et al.*, 2015; Giannoukos *et al.*, 2019).

c. La chimiotaxonomie :

La chimiotaxonomie est la discipline visant à identifier et à classer les organismes les uns par rapport aux autres en se basant sur leur profil chimique. Ces profils chimiques sont essentiellement basés sur les métabolites (solubles et volatils) produits par les organismes. La chimiotaxonomie basée sur les COV est développée surtout dans l'étude des champignons (Polizzi *et al.*, 2012; Müller *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2020, 2021).

d. L'écotoxicologie :

Très peu d'études (cinq) de toxicologie environnementale ou d'écotoxicologie se sont intéressées à la mise en évidence de COV après exposition d'organismes à divers xénobiotiques. Ainsi, des bactéries du sol exposées à des pesticides par Hidalgo et collaborateurs (Hidalgo *et al.*, 2019) ou sur le microbiote intestinal exposé à des polluants d'origine alimentaire par Défois

et collaborateurs (Defois *et al.*, 2017, 2018) ont permis de mettre en évidence des COV marqueurs. Il en est de même pour deux études (Fernandes *et al.* 2023; Hidalgo *et al.*, *in prep*) ayant permis la mise en évidence d'une signature volatile chez l'abeille mellifère, *Apis mellifera*, témoignant d'une exposition à des insecticides.

C. Les COV, médiateurs des interactions du vivant :

Les COV, par leurs propriétés physico-chimiques, diffusent facilement dans l'environnement et peuvent être de bons messagers infochimiques à moyenne et longue distance (par opposition aux métabolites solubles qui sont des messagers chimiques à courte distance). On parle alors de composés sémiochimiques. Outre leur rôle dans les interactions entre organismes, les COV peuvent aussi être utilisés comme source de nutriments.

A ce jour, plus de 2000 COV microbiens émis par près de 650 espèces bactériennes et 385 espèces fongiques (Lemfack *et al.*, 2018) sont répertoriés dans une base de données spécifique aux COV microbiens : *mVOCs* (<https://bioinformatics.charite.de/mvoc/>). Il existe également une base de données spécifique aux composés sémiochimiques chez les insectes et les végétaux (contenant plus de 3500 composés) : *The Pherobase* (<https://www.pherobase.com/>) (El-Sayed, 2023).

1. Les interactions intra-règne :

a. Chez les microorganismes :

i. Chez les bactéries :

Les profils volatils bactériens sont caractérisés par la présence d'alcools, d'alcane, d'alcènes, de cétones, d'esters, de pyrazines, de lactones, de terpènes, de composés nitrés, de composés soufrés et d'acides (Effmert *et al.*, 2012; Peñuelas *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2015; Veselova *et al.*, 2019).

Les COV bactériens participent à de nombreuses interactions entre bactéries et peuvent : stimuler ou inhiber la croissance, influencer la production de métabolites secondaires, favoriser ou diminuer la mobilité, favoriser ou inhiber la formation de biofilm, stimuler ou inhiber la virulence des bactéries pathogènes, favoriser la tolérance/résistance aux antibiotiques ou encore déclencher la sporulation. Certains COV bactériens présentent des activités bactéricides ou bactériostatiques (Kai *et al.*, 2009; Audrain *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015;

Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Tyc *et al.*, 2017; Veselova *et al.*, 2019; Netzker *et al.*, 2020; Weisskopf *et al.*, 2021). Le résultat de l'interaction bactérie-bactérie médiée par les COV est fortement dépendant du couple de bactéries considéré (un même COV peut avoir un effet différent en fonction des bactéries présentes) (Kai *et al.*, 2009; Audrain *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Tyc *et al.*, 2017; Veselova *et al.*, 2019; Netzker *et al.*, 2020; Weisskopf *et al.*, 2021).

ii. Chez les champignons :

Les profils volatils fongiques sont caractérisés par la présence d'une grande diversité de composés : alcools, alcanes, alcènes, alcynes, aldéhydes, cétones, composés aromatiques, halogénés (chlorés et bromés), nitrés, soufrés, acides, ester et terpènes (Effmert *et al.*, 2012; Peñuelas *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2015).

Comparé aux COV bactériens, il y a peu d'informations sur le rôle des COV fongiques dans les interactions champignon-champignon. Ils peuvent participer à l'inhibition de la croissance hyphale ou de la germination sporale, à la communication dans le processus de colonisation du sol et à la modulation de l'expression des gènes de virulence chez les champignons phytopathogènes. Certains COV fongiques présentent une activité antifongique. Le résultat de l'interaction champignon-champignon médiée par les COV est fortement dépendant du couple de champignons considéré (Morath *et al.*, 2012; Polizzi *et al.*, 2012; Peñuelas *et al.*, 2014; Schmidt *et al.*, 2015; Schulz-Bohm *et al.*, 2017).

b. Chez les insectes :

Chez les insectes, la communication sémi chimique se fait par le biais de deux groupes de composés : les phéromones et les composés allélochimiques (allomone et kairomone par exemple) (Kasinger *et al.*, 2008; Saha and Chandran, 2017; El-Ghany, 2019). Comme indiqué précédemment chez les microorganismes, un composé sémi chimique donné peut avoir divers rôles en fonction du couple insecte-insecte considéré voire de l'espèce d'insecte considéré.

i. Pheromones :

Les phéromones sont des messagers de communication intraspécifiques. Il existe plusieurs groupes de phéromones ayant des propriétés particulières. On trouve par exemple (Kasinger *et al.*, 2008; Saha and Chandran, 2017; El-Ghany, 2019) :

- Les phéromones d'alarme qui permettent d'alerter les membres d'une même espèce sur la présence d'une menace.
- Les phéromones d'agrégation qui attirent les insectes à un site profitable à la reproduction.
- Les phéromones sexuelles en général produites par les femelles pour attirer les mâles lors de la période de reproduction.
- Les phéromones dissuadant l'oviposition produites par les femelles ayant pondus leurs œufs et ayant pour but de dissuader une autre femelle de venir pondre ses œufs au même endroit
- Les phéromones de pistes produites chez les insectes sociaux pour que les congénères retrouvent les sources de nourriture ou d'eau déjà découvertes.

ii. Allomones :

Les allomones sont des messagers de communication interspécifiques dont le bénéfice de l'interaction revient à l'émetteur du signal. C'est par exemple le cas des interactions prédateur-proie entre un insecte qui produit des messagers volatils et une guêpe parasitoïde prédatrice qui est repoussée par ces composés (dans certains cas, les allomones peuvent être toxiques pour l'insecte receveur) (Kasinger *et al.*, 2008; Saha and Chandran, 2017; El-Ghany, 2019).

iii. Kairomones :

Les kairomones sont des messagers de communication interspécifiques dont le bénéfice de l'interaction revient à l'organisme recevant le signal. C'est également, par exemple, le cas des interactions prédateur-proie entre un insecte qui produit des messagers volatils et une guêpe parasitoïde prédatrice qui est attirée par ces composés (Kasinger *et al.*, 2008; Saha and Chandran, 2017; El-Ghany, 2019).

c. Chez les plantes :

Le profil volatil des plantes est dominé par les terpènes, les composés aromatiques, les dérivés d'acides gras et d'acides aminés (Delory *et al.*, 2016).

Chez les végétaux, les COV participent soit à des interactions de compétition, soit à des interactions de coopération. Certains COV racinaires ont la capacité de bloquer la croissance racinaire ou d'empêcher la germination des graines. D'autres COV permettent la transmission de signaux d'alarme aux plantes voisines pour leur permettre de mettre en place leurs mécanismes de défense dans le cas d'une attaque par un herbivore ou un agent pathogène (Baldwin *et al.*, 2006; Rowan, 2011; Peñuelas *et al.*, 2014; Delory *et al.*, 2016).

2. Les interactions inter-règne :

a. Interactions bactéries-champignons :

L'interaction médiée par les COV la mieux décrite entre bactérie et champignon est la fongistase. Ce phénomène, mis en évidence dans les années 1950, conduit à l'inhibition de la germination des spores fongiques ou de la croissance mycélienne chez les champignons phytopathogènes. Ce mécanisme est lié à la production de COV par cinq grandes familles de bactéries du sol : les Rhizobacteriaceae, les Xanthomonadaceae, les Micrococcaceae, les Alcaligenaceae et les Bacillaceae. En 2007, plus de 1000 bactéries ont été identifiées comme pouvant participer au processus de fongistase (Kai *et al.*, 2009; Effmert *et al.*, 2012; Peñuelas *et al.*, 2014; Audrain *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2015; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Veselova *et al.*, 2019; Netzker *et al.*, 2020).

Les COV bactériens peuvent avoir d'autres effets sur les champignons (phytopathogènes en général) : modification de la morphologie (déformation des hyphes, vacuolisation, disparition des septations, granulations, ...) conduisant à la lyse des cellules fongiques, modification de l'activité de certaines enzymes (tyrosinase et laccase notamment) ou modification de l'expression de certains gènes (en lien avec la phytopathogénicité ou le métabolisme notamment). Les COV bactériens peuvent également avoir des effets bénéfiques notamment sur la croissance et le développement des champignons mycorhiziens *via* les *Mycorrhiza Helper Bacteria* (Kai *et al.*, 2009; Effmert *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2015).

Les COV fongiques peuvent également avoir un impact sur les bactéries notamment en stimulant la croissance de certaines espèces de bactéries bénéfiques pour les végétaux (comme

Pseudomonas fluorescens) ou en inhibant la croissance de bactéries phytopathogènes. Il a également été montré que les COV fongiques pouvaient modifier le profil d'expression des bactéries phytopathogènes (Morath *et al.*, 2012; Peñuelas *et al.*, 2014; Schulz-Bohm *et al.*, 2017).

Le résultat de l'interaction bactérie-champignon médiée par les COV est fortement dépendant du couple de microorganismes considéré.

b. Interactions bactéries-protistes :

La majorité des études réalisées sur les interactions liées aux COV entre bactérie et protiste sont focalisées sur les interactions phagotrophe (participent à la régulation des populations microbiennes dans les écosystèmes aquatiques). Il a été montré que les protistes phagotrophes sélectionnent leurs proies grâce aux COV émis par les bactéries qui agissent comme des agents attractants ou répulsifs pour les prédateurs (d'autres paramètres entrent en compte comme la taille de la proie, ses propriétés de surface ou encore sa composition biochimique) (Gaines *et al.*, 2019). Les COV bactériens semblent également avoir un impact sur la croissance et la mobilité des protistes phagotrophes. Dans certains cas, les COV émis par les bactéries peuvent être toxiques voire létales pour les protistes (Kai *et al.*, 2009; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Gaines *et al.*, 2019; Veselova *et al.*, 2019; Netzker *et al.*, 2020).

c. Interactions microorganismes-plantes :

Les COV bactériens, stimulent essentiellement la croissance des plantes auxquelles sont associées les bactéries émettrices, que ce soit par une action directe sur le métabolisme ou indirecte (stimulation des mécanismes de défense conduisant à une amélioration de la *fitness* de la plante hôte). Dans certains cas, les bactéries participent activement au processus de compétition entre les végétaux par l'intermédiaire des COV qui peuvent être toxiques et inhiber la germination ou la croissance des plantes (Kai *et al.*, 2009; Peñuelas *et al.*, 2014; Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Tyc *et al.*, 2017; Veselova *et al.*, 2019; Netzker *et al.*, 2020).

Les COV fongiques ont globalement le même effet de stimulation ou d'inhibition de la croissance végétale que les COV bactériens dans les interactions champignon-plante (Morath *et al.*, 2012).

Les COV émis par les végétaux peuvent être utilisés comme source de carbone par les microorganismes présents au niveau racinaire. Ils ont également un rôle attractant pour les

bactéries et champignons bénéfiques et un rôle répulsif ou de défense contre les microorganismes phytopathogènes (Schulz-Bohm *et al.*, 2017; Veselova *et al.*, 2019).

d. Interactions microorganismes-insectes :

Les COV microbiens agissent chez les insectes comme les composés sémiochimiques qu'ils sont eux-mêmes capables de produire. En effet, les COV microbiens peuvent agir comme des phéromones (agrégation, localisation d'une source nutritive ou d'eau, stimulation et régulation de l'oviposition, attraction des insectes du sexe opposé, sélection du site de reproduction, orientation), des allomones (production de composés répulsifs signalant une mauvaise source alimentaire, un danger ou la présence de microorganismes entomopathogènes) ou de kairomones (production de composés attractant par les microorganismes entomopathogènes ou pour les prédateurs et parasitoïdes). Certains COV microbiens présentent également des propriétés insecticides (Kai *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011; Morath *et al.*, 2012; Davis *et al.*, 2013; Audrain *et al.*, 2015; Veselova *et al.*, 2019).

e. Interactions insectes-plantes :

Comme dans le cas des interactions microorganisme-insecte, les COV émis par les végétaux peuvent agir comme les composés sémiochimiques que les insectes produisent, à savoir comme des allomones (production de composés répulsifs ou toxiques pour les insectes phytophages, ou attractant pour les prédateurs et les parasitoïdes de ces mêmes insectes phytophages) ou de kairomones (production de composés attirant les insectes phytophages, stimulation de l'oviposition chez ces insectes). Il existe un troisième type d'interaction médiée par les COV entre insectes et végétaux : le composé émis est à la fois bénéfique pour le producteur et pour le receveur (on parle alors de synomone). C'est le cas dans la pollinisation lors de laquelle la plante émet des composés attirant les pollinisateurs qui trouvent une source de nourriture (nectar, pollen) et d'eau. En retour, les pollinisateurs permettent la reproduction des plantes *via* le transport des cellules reproductrices mâles (contenues dans le pollen) des végétaux lors de l'activité de butinage (Kasinger *et al.*, 2008; Rowan, 2011; Saha and Chandran, 2017; El-Ghany, 2019).

V. Le gène *tspo*, focus sur un biomarqueur potentiel du stress pesticide :

Dans la troisième partie l'introduction bibliographique a été abordé le concept d'approche biomarqueur. Ici nous allons nous focaliser sur à un biomarqueur génique potentiel : le gène *tspo* (*TranSlocator PrOtein*). Le gène *tspo* a été mis en évidence comme potentiel biomarqueur du stress pesticide (deltaméthrine) dans une étude transcriptomique antérieure (non-publiée) réalisée chez le protiste cilié *Paramecium tetraurelia*. Dans cette étude, une forte surexpression du gène a pu être mise en lien avec une exposition à une faible dose (CE10) d'insecticide. Dans cette partie nous allons d'abord nous intéresser à la découverte des protéines TSPO et leur diversité dans le monde vivant, puis nous nous intéresserons à la structure et aux fonctions de ces protéines chez différents groupes d'organismes et enfin nous ferons un focus sur le gène *tspo* dans le genre *Pseudomonas*.

A. Découverte de TSPO et répartition dans le monde vivant :

1. Dès récepteurs périphériques aux benzodiazépines à la protéine TSPO :

Les benzodiazépines sont des composés chimiques aux propriétés anxiolytique et myorelaxante qui inhibent l'influx nerveux (Anholt *et al.*, 1985, 1986; Gavish *et al.*, 1999). Elles interagissent avec des récepteurs particuliers dans le système nerveux central que l'on nomme des CBR (*Central Benzodiazepine Receptor*). Ces CBR sont en réalité des GABA récepteurs de sous-type A (GABA_A). En 1977, Braestrup et Squires ont mis en évidence l'existence de site de liaison aux benzodiazépines (diazépam notamment) dans les tissus périphériques du rat (foie, rein et poumon). Ces récepteurs, nommés PBR (*Peripheral Benzodiazepine Receptor*) (Braestrup and Squires, 1977) ont ensuite été découverts dans l'ensemble des tissus périphériques et dans le système nerveux central (à l'exclusion des cellules neuronales qui en sont dépourvues) (Anholt *et al.*, 1985, 1986; Gavish *et al.*, 1999; Chapalain *et al.*, 2009; Austin *et al.*, 2013). La distribution de ces PBR n'est pas homogène dans les tissus et est plus importante dans les tissus en lien avec la production d'hormones stéroïdiennes (la densité la plus importante est répertoriée dans le *cortex* de la glande surrénale chez les mammifères) (Gavish *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Le PBR est un complexe hétéromérique constitué de trois protéines : un canal anionique volage dépendant (VDAC, *Voltage Dependent Anionic Channel*), un transporteur d'adénine (ANT, *Adenine*

Nucleotide Transporter) et une protéine de 18 kDa possédant un domaine de liaison au cholestérol (Gavish *et al.*, 1999; Delavoie *et al.*, 2003; Veenman *et al.*, 2016).

Ce complexe protéique a surtout été étudié chez les mammifères jusqu'à la découverte, dans les années 1990, d'un homologue de la protéine de 18 kDa chez la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* (Yeliseev and Kaplan, 1995) puis, en 2004, chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Lindemann *et al.*, 2004). En 2006, Papadopoulos et collaborateurs ont unifiés les connaissances autour de ces protéines de 18 kDa et ont choisi de les généraliser sous le nom de famille TSPO du fait de leur potentiel rôle dans le transport du cholestérol et des porphyrines (Papadopoulos *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2015).

2. La protéine TSPO dans le monde vivant :

La protéine TSPO est une protéine ubiquiste présente dans les trois domaines du vivant (eucaryote, bactérie, archée) (**Figure 31**) (Fan *et al.*, 2012). Il existe quelques exceptions, notamment chez des organismes modèles comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou les bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Riond *et al.*, 1991; Korkhov *et al.*, 2010; Leneuve-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

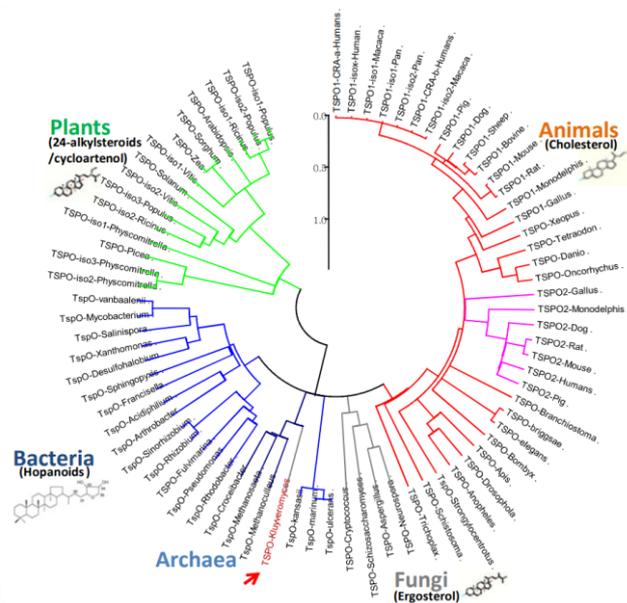


Figure 31. Arbre phylogénétique des protéines de la famille TSPO dans les trois domaines du vivant (figure extraite de Fan *et al.*, 2012).

Cette famille de protéines est caractérisée par une homologie de séquence plutôt faible : 30% entre mammifère et bactérie, 25% entre mammifère et plante et 15% entre bactérie et

plante (Yeliseev *et al.*, 1997; Guillaumot *et al.*, 2009; Selvaraj and Stocco, 2015; Senicourt, 2016). En revanche, il y a une très grande conservation dans la structure tertiaire/quaternaire (repliement, hydrophobicité) de la protéine quel que soit l'organisme considéré (Chapalain *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2012; Batoko *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Les protéines de la famille TSPO appartiennent à une ancienne famille protéique (suspectée de faire partie du complexe protéique *core* prédit chez LUCA, *Last Universal Common Ancestor*) dont la structure s'est conservée au cours de l'évolution bien que les fonctions associées semblent avoir divergées (Fan and Papadopoulos, 2013).

B. Structure et localisation cellulaire de la protéine TSPO :

1. Chez les mammifères :

Chez les mammifères, il existe deux protéines TSPO (TSPO1 et TSPO2). La protéine TSPO1 est majoritairement présente, TSPO2 étant uniquement exprimée dans les complexes membranaires du noyau et du réticulum endoplasmique des érythrocytes en cours de maturation (dans la suite de ce manuscrit, TSPO fera toujours référence à TSPO1) (Fan *et al.*, 2012; Fan and Papadopoulos, 2013; Batoko *et al.*, 2015).

La protéine TSPO est caractérisée comme étant une protéine mitochondriale codée par un gène nucléaire. Elle est plus particulièrement associée à la membrane externe des mitochondries (Anholt *et al.*, 1986; Fan *et al.*, 2012; Austin *et al.*, 2013; Jaremko *et al.*, 2014; Gut *et al.*, 2015). Elle peut cependant être rencontrée dans d'autres types de membranes (mais en faible quantité) : nucléaire, plasmique, lysosomale, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique ou des péroxysomes (Gavish *et al.*, 1999; Chapalain *et al.*, 2009; Austin *et al.*, 2013).

La structure des protéines de la famille TSPO étant très conservée, elle se présente toujours sous la forme d'une protéine contenant cinq domaines transmembranaires hydrophobes (en forme d'hélices α) reliés les uns aux autres par des boucles intra- et extra-mitochondriales (**Figure 32**) (Korkhov *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2012; Austin *et al.*, 2013; Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Veenman *et al.*, 2016). Chez les mammifères, TSPO fonctionne sous forme de monomère (Delavoie *et al.*, 2003; Jaremko *et al.*, 2014; Gut *et al.*, 2015). Il est également possible de la rencontrer sous forme dimérique bien que son fonctionnement sous cette forme soit altéré. La mise en place de ces dimères (*via* des

ponts dityrosine) semble plutôt liée au recyclage de la protéine (Delavoie *et al.*, 2003; Jaremko *et al.*, 2015).

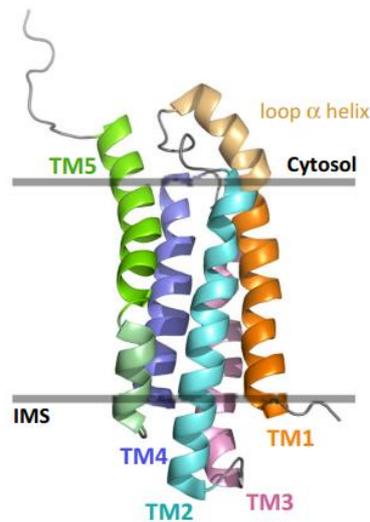


Figure 32. Représentation schématique de la structure en trois dimensions du monomère TSPO en vue latérale. TM : domaines transmembranaires ; IMS : espace intermembranaire mitochondrial (figure extraite de Selvaraj and Stocco, 2015).

2. Chez les végétaux :

s

Chez les végétaux, plusieurs sous-types de protéines TSPO, dont les fonctions peuvent être différentes ont été observés. D'une manière générale, les TSPO du règne végétal sont plus longues que celle rencontrées chez les mammifères et les microorganismes. En moyenne, elles contiennent environ 196 acides aminés soit une taille de 21 kDa. Cette différence de taille s'explique par un ajout d'environ 40 acides aminés en position C-terminale (Lindemann *et al.*, 2004; Guillaumot *et al.*, 2009; Senicourt, 2016). La structure cristalline (ou par RMN) des TSPO végétales n'ayant pas été réalisée, les données de structures sont uniquement basées sur les profils d'hydrophobicité des séquences en acides aminés et montrent la présence caractéristique des cinq domaines transmembranaires hydrophobes (**Figure 33**) (Fan *et al.*, 2012; Senicourt, 2016).

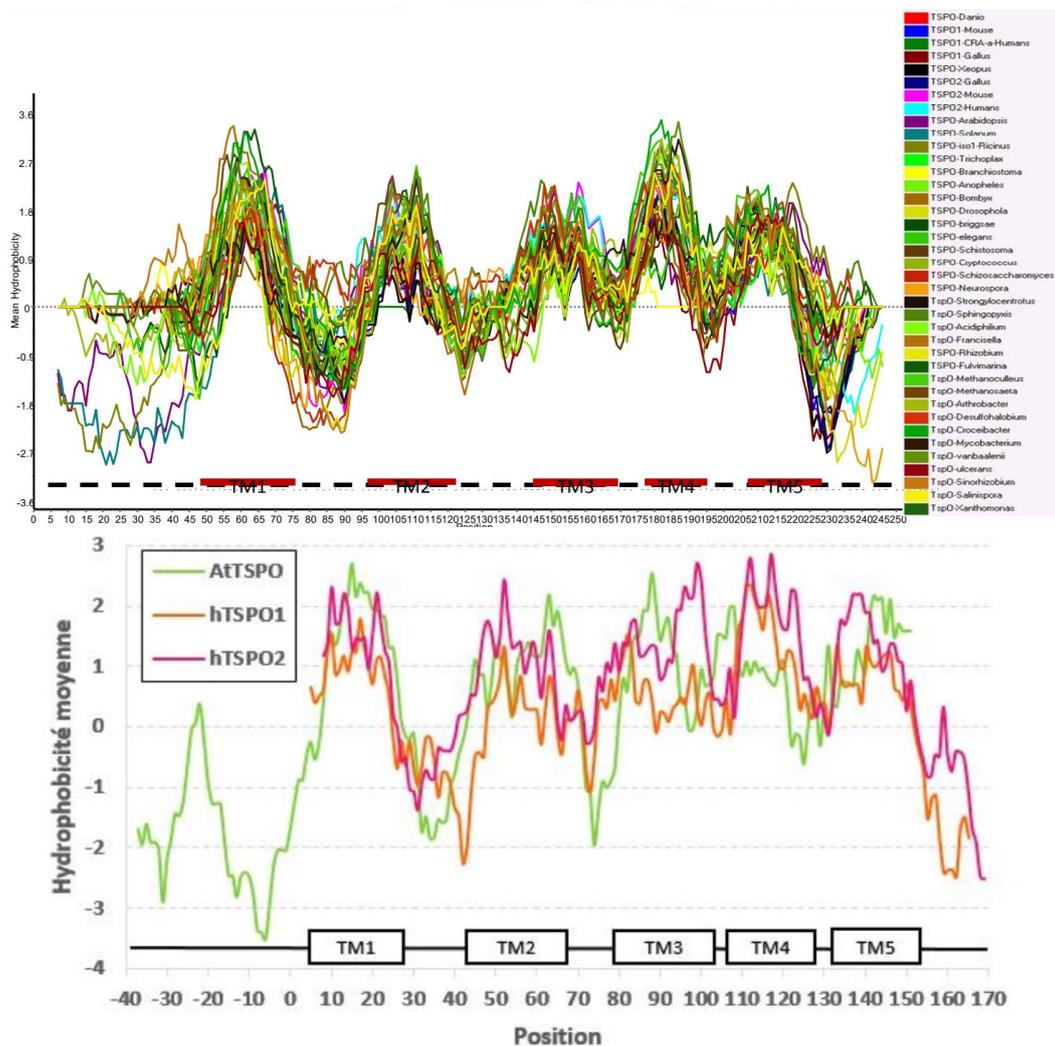


Figure 33. Profils d'hydrophobicité de différentes séquences protéiques de la famille TSPO. Plus le chiffre est grand et plus la fraction concernée de la séquence en acides aminés est hydrophobe, plus le chiffre est petit plus la fraction de la séquence est hydrophile. Les profils de la partie haute de la figure ont été extraits de Fan *et al.*, 2012. Les profils de la partie basse sont extraits de Senicourt, 2016 (AtTSPO : *Arabidopsis thaliana* TSPO, hTSPO1 et hTSPO2 : *human* TSPO 1 et 2). En bas de chaque profil est présentée la localisation des différents domaines transmembranaires (TM) de la protéine TSPO mitochondriale de mammifère.

La localisation cellulaire des protéines TSPO chez les végétaux est encore débattue. Initialement, elles étaient indiquées comme étant des protéines mitochondriales et éventuellement plastidiales (Lindemann *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2007; Senicourt, 2016). Cependant, l'amélioration des approches d'imagerie et de biologie moléculaire ont permis de caractériser la présence de ces protéines uniquement à la surface de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique (Guillaumot *et al.*, 2009; Vanhee *et al.*, 2011a; Hachez *et al.*, 2014; Senicourt, 2016).

3. Chez les bactéries :

La première protéine TSPO bactérienne fut rapportée en 1995 par Yeliseev et Kaplan chez *Rhodobacter sphaeroides* (protéine constituée de 148 acides aminés soit une taille d'environ 17 kDa). Elle fut dans un premier temps nommée TspO (*Tryptophan-rich sensory protein O*) du fait de sa richesse en tryptophane et de son potentiel rôle de senseur à l'oxygène (Yeliseev and Kaplan, 1995), avant d'être renommée TSPO. S'en est suivi la découverte d'autres membres de cette famille chez une grande diversité de bactéries y compris pathogènes (*Bacillus anthracis*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Clostridium perfringens*). Les plus étudiées sont celles identifiées chez *Bacillus cereus*, *R. sphaeroides*, *P. fluorescens*, *Chlorobium tepidum* et *Sinorhizobium meliloti* (Davey and De Bruijn, 2000; Chapalain *et al.*, 2009; Ginter *et al.*, 2013; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

La structure cristalline de la protéine TSPO de *B. cereus* et de *R. sphaeroides* (les seules actuellement disponibles) (**Figure 34**) montrent la présence de cinq domaines transmembranaires. A la différence de la protéine mitochondriale, les TSPO bactériennes fonctionnent uniquement sous forme dimérique (Chapalain *et al.*, 2009; Korkhov *et al.*, 2010; Jaremko *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Les protéines TSPO bactériennes sont localisées au niveau de la membrane externe (*R. sphaeroides*, *S. meliloti*) ou de la membrane plasmique (*P. fluorescens*) (Davey and De Bruijn, 2000; Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

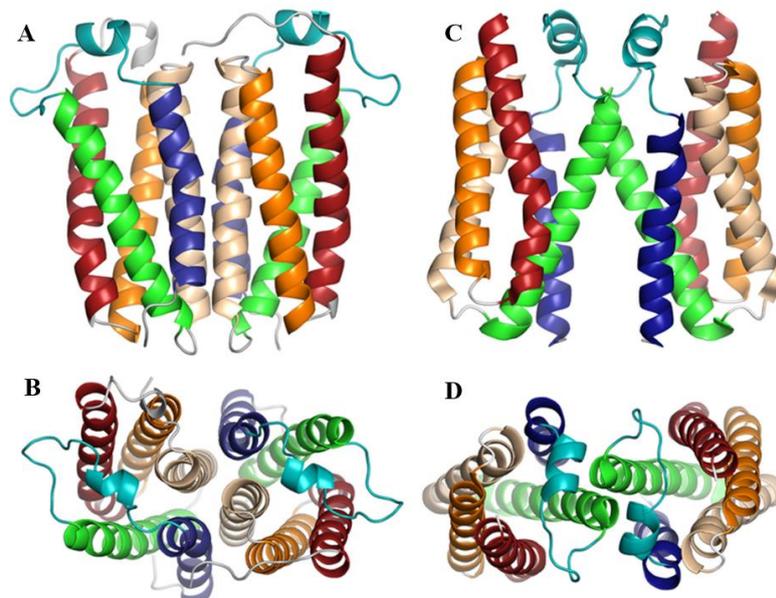


Figure 34. Représentation schématique de la structure en trois dimensions du dimère TSPO de *Rhodobacter sphaeroides* en vue latérale (A) ou en vue du dessus (B) et de *Bacillus cereus* en vue latérale (C) ou en vue du dessus (D) (figure extraite de Li *et al.*, 2016).

C. La protéine TSPO, une protéine aux multiples fonctions ?

1. Chez les mammifères :

Table 4. Les principaux processus associés aux protéines TSPO1 chez les mammifères (adaptée de Papadopoulos *et al.*, 2006).

	Fonctions proposées	Commentaires
Processus cellulaires et physiologiques	Biosynthèse des hormones stéroïdiennes	Domaine de liaison au cholestérol. L'utilisation de ligand TSPO favorise le transport du cholestérol dans les mitochondries
	Métabolisme des porphyrines	TSPO est capable de se lier aux porphyrines. La biosynthèse de l'hème est en partie régulée par TSPO
	Transport ionique	L'utilisation de ligand TSPO entraîne une libération d'ions calcium provenant des mitochondries
	Prolifération et différenciation cellulaire	TSPO semble impliqué dans ces processus mais démonstration limitée à certains types cellulaires (la plupart des études sont focalisées sur des cellules cancéreuses)
	Immunité	TSPO semble avoir un lien avec la libération de cytokines et d'immunoglobulines par les cellules immunocompétentes
	Fonctionnement mitochondrial	TSPO participe à la régulation de la respiration mitochondriale et au flux d'ions calcium
	Apoptose	Des ligands spécifiques TSPO stimulent le processus d'apoptose
Processus pathologiques	Lésion cérébrale	Des ligands spécifiques TSPO réduisent le développement des astrocytes <i>in vitro</i> (cellules qui prolifèrent rapidement à la suite d'une lésion cérébrale)
	Epilepsie	Des ligands spécifiques TSPO réduisent les crises d'épilepsie sur modèle animal
	Maladies neurodégénératives	Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont une densité de TSPO importante au niveau du système nerveux central, à l'inverse les patients atteints de la maladie de Parkinson ont une densité faible de TSPO
	Troubles psychiatriques	TSPO serait impliquée dans les troubles psychiatriques liés au stress (choc <i>post</i> traumatique notamment)
	Cancer	TSPO est impliquée dans la prolifération cellulaire, la surexpression de <i>tspo</i> est corrélée avec certains types de cancers
	Imagerie médicale	TSPO est un bon marqueur des lésions et de l'inflammation au niveau cérébral

A partir des données résumées dans la **Table 4**, les protéines TSPO semblent être impliquées dans de nombreux processus cellulaires et physiologiques (stéroïdogénèse, métabolisme des porphyrines, homéostasie mitochondriale, processus apoptotique, ...) et

pathologiques (cancer, maladie neurodégénérative, inflammation et traumatisme au niveau du système nerveux central, ...) chez les mammifères. Une grande diversité de ligands exogènes (benzodiazépines, isoquinolines, benzoxazolones, benzoaxines, ...) et trois ligands endogènes (cholestérol, porphyrines et l'inhibiteur de la fixation du diazépam) ont été mis en évidence pour cette protéine (Gavish *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2012; Austin *et al.*, 2013; Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015; Selvaraj and Stocco, 2015; Li *et al.*, 2016; Senicourt, 2016). TSPO est donc devenu rapidement un marqueur histologique, physiologique et pharmacologique des processus pathologiques liés au stress cellulaire notamment dans la réponse inflammatoire et métabolique.

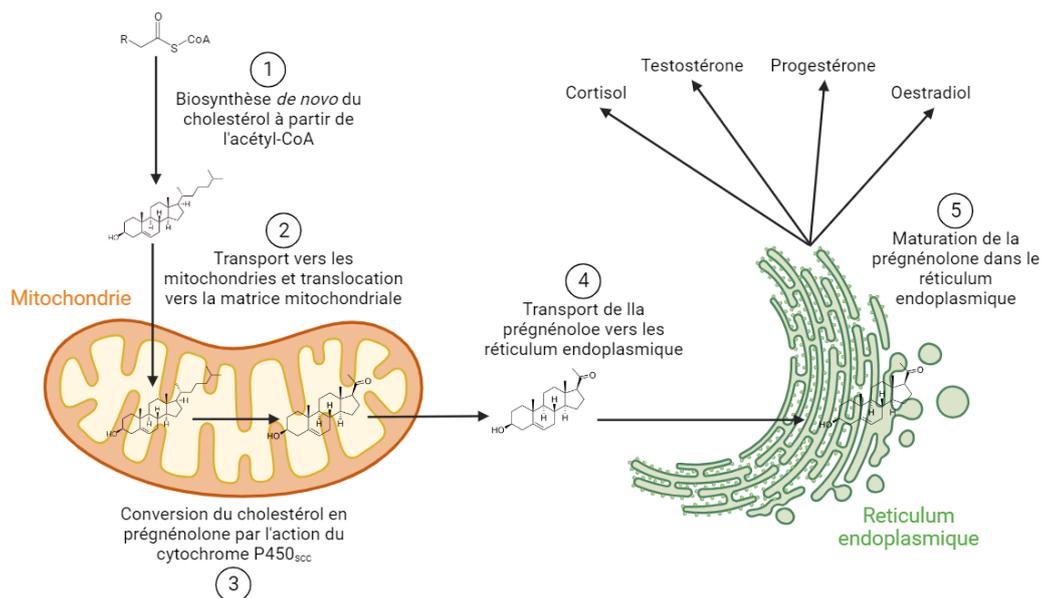


Figure 35. Schéma simplifié de la stéroïdogénèse.

Dans cette section, à titre d'exemple, nous discuterons du rôle de la protéine TSPO dans un processus physiologique « normal » : le transport du cholestérol et la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (fonction la mieux décrite à ce jour et pour laquelle les données sont les plus précises). Le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes. Le cholestérol peut avoir plusieurs origines cellulaires : synthèse *de novo* à partir de l'acétyl-CoA (*via* l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase), utilisation des gouttelettes lipidiques (conversion du cholestérol estérifié en cholestérol *via* la cholestérol estérase), recyclage des HDL et des LDL (*High Density Lipoprotein* ou *Low Density Lipoprotein*) ou de la membrane plasmique. Le cholestérol formé dans le cytoplasme est transporté jusqu'aux mitochondries par les protéines StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*). La biosynthèse des hormones stéroïdiennes commence avec l'importation du cholestérol dans la matrice mitochondriale où il est converti

en prégnénolone *via* le cytochrome P450_{sc} qui clive la chaîne aliphatique du cholestérol. La prégnénolone quitte alors la mitochondrie et rejoint le réticulum endoplasmique où elle est maturée (réactions enzymatiques) pour libérer les diverses hormones stéroïdiennes (cortisol, testostérone, progestérone, œstradiol, ...) (**Figure 35**) (Papadopoulos *et al.*, 2015; Senicourt, 2016).

La translocation du cholestérol dans les mitochondries est une étape limitante de la stéroïdogénèse. L'abondance des protéines TSPO dans les cellules des tissus participant activement à la stéroïdogénèse (glande surrénale, testicule, ...), l'existence sur ces protéines d'un site de liaison au cholestérol et sa localisation dans la membrane externe des mitochondries ont conduit les chercheurs à supposer son implication dans la translocation du cholestérol du cytoplasme vers la matrice mitochondriale (Gavish *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2012; Austin *et al.*, 2013; Fan and Papadopoulos, 2013; Guo *et al.*, 2015; Gut *et al.*, 2015; Papadopoulos *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016).

Un modèle moléculaire impliquant les protéines TSPO dans le transport et la conversion du cholestérol a alors été développé en se basant sur le comportement de TSPO soit comme un translocateur, soit comme un canal permettant le passage du cholestérol au travers de la membrane externe des mitochondries (Lacapère and Papadopoulos, 2003). On parle d'ailleurs de transduceosome et de métabolon (méga-canal permettant la traversée des deux membranes mitochondriales) (**Figure 36**) (Liu *et al.*, 2006; Rone *et al.*, 2012; Papadopoulos *et al.*, 2015). Le transduceosome est un complexe protéique qui englobe des protéines cytoplasmiques et des protéines de la membrane externe des mitochondries (dont TSPO). Ce complexe est responsable de l'ancrage du cholestérol à la surface de la membrane externe des mitochondries (Liu *et al.*, 2006; Papadopoulos *et al.*, 2015). Le métabolon, quant à lui est un complexe protéique contenant uniquement des protéines mitochondriales (des membranes externe et interne ainsi que de l'espace intermembranaire), dont les protéines TSPO. Ce complexe serait responsable de la translocation du cholestérol vers la matrice mitochondriale et de la conversion du cholestérol en prégnénolone (Rone *et al.*, 2012; Papadopoulos *et al.*, 2015). Cette machinerie moléculaire fonctionnerait grâce à une régulation hormonale (Papadopoulos *et al.*, 2015).

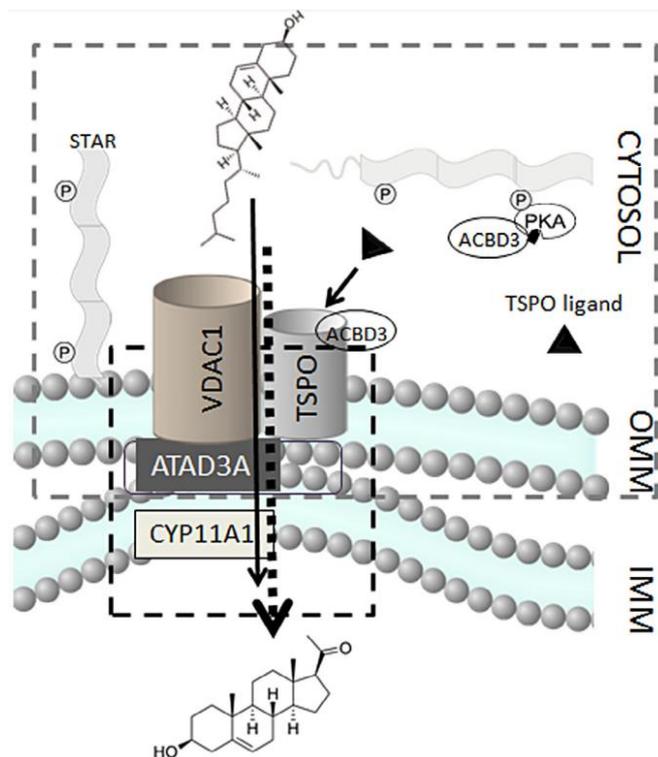


Figure 36. Représentation schématique des protéines formant le transduceosome et le métabolisme. OMM : membrane externe de la mitochondrie; IMM : membrane interne de la mitochondrie. Le transduceosome est constitué des protéines cytoplasmiques et des protéines de la membrane externe de la mitochondrie (encadré gris). Le métabolisme quant à lui (encadré noir) est constitué uniquement de protéines mitochondriales. Une stimulation hormonale permet l'activation d'une voie de signalisation dépendante de l'AMP cyclique qui conduit à l'activation de la protéine PKA (*Protein Kinase A*). La protéine PKA interagit avec la protéine ACBD3 (*Acyl-CoA Binding Domain 3*). Le complexe PKA-ACBD3 permet la phosphorylation des protéines StAR. Les protéines StAR phosphorylées s'ancrent alors dans la membrane externe de la mitochondrie et interagissent avec les autres protéines du transduceosome. Le cholestérol porté par les protéines StAR sera alors transféré à la protéine TSPO qui permettra le passage de la membrane externe de la mitochondrie. Le cholestérol est alors transféré à la protéine ATAD3A (*ATPase Domain family AAA*) située à la jonction entre les deux membranes mitochondriales. La protéine ATAD3A permet le passage du cholestérol au travers de la membrane interne de la mitochondrie. La molécule de cholestérol est alors transmise à la protéine CYP11A1 (connue aujourd'hui sous le nom de cytochrome P450_{scc}) dans la matrice mitochondriale où le cholestérol est converti en prégnénolone (figure extraite de Papadopoulos *et al.*, 2015 ; légende adaptée de Senicourt 2016).

2. Chez les végétaux :

Chez les végétaux, les protéines TSPO sont produites de manière transitoire et sont impliquées dans la réponse au stress. L'acide abscissique est une des principales phytohormones impliquées dans la signalisation du stress abiotique chez les végétaux (hydrique, osmotique, thermique). Il a été montré que l'augmentation de la concentration en acide abscissique induisant l'expression du gène *tspo* et entraînait donc la production des protéines TSPO qui à leur tour, activaient une enzyme (8'-hydrolase) participant au catabolisme de l'acide

abscissique. TSPO participe donc indirectement à la régulation de la perception du stress chez les végétaux (recyclage de l'acide abscissique). L'augmentation de la concentration en acide abscissique est également à mettre en lien avec une augmentation de la quantité d'hème libre. L'hème libre est associé à la génération de stress oxydant toxique pour les cellules. TSPO est également impliquée dans la séquestration et la dégradation de l'hème libre dans les cellules végétales limitant ainsi les effets du stress oxydant. Dans le cas d'un stress hydrique, les protéines TSPO semblent se lier à certaines aquaporines pour limiter les pertes en eau (Guillaumot *et al.*, 2009; Vanhee and Batoko, 2011; Vanhee *et al.*, 2011b; Hachez *et al.*, 2014; Senicourt, 2016).

3. Chez les bactéries :

Chez les bactéries, la protéine TSPO peut exercer des fonctions différentes d'un genre bactérien à un autre. Dans cette section, nous allons discuter du rôle des protéines TSPO dans la transition hétérotrophie-autotrophie chez *R. sphaeroides*, dans la biodégradation des porphyrines et dans l'induction d'un système de réponse au stress nutritif chez *S. meliloti*.

Chez *R. sphaeroides*, TSPO est impliquée dans le passage d'un mode de vie hétérotrophe (respiration) à un mode de vie autotrophe (photosynthèse anoxygénique) suite à une diminution de la concentration en dioxygène et/ou de l'intensité lumineuse. Lorsque la concentration en oxygène baisse, la bactérie déclenche la synthèse des éléments nécessaires à la réalisation de la photosynthèse (photosystèmes notamment). Chez des bactéries mutantes pour le gène *tspo*, une augmentation importante de la synthèse de bactériochlorophylle (pigment essentiel à la photosynthèse chez la bactérie) a été observée, suggérant l'implication de la protéine TSPO dans la régulation de la production de ce pigment et la mise en place des systèmes photosynthétiques (Yeliseev and Kaplan, 1995, 1999, 2000; Yeliseev *et al.*, 1997; Zeng and Kaplan, 2001; Batoko *et al.*, 2015).

Cette régulation se ferait par l'intermédiaire des porphyrines et d'un système répresseur/anti-répresseur (PpsR/AppA). En conditions favorisant l'hétérotrophie (présence d'oxygène), le répresseur PpsR bloque l'expression des gènes liés à la photosynthèse. Lorsque la teneur en oxygène diminue (ce qui favorise la transition vers l'autotrophie), l'anti-répresseur AppA se lie au répresseur PpsR, ce qui favorise l'expression des gènes de la photosynthèse. La production de la bactériochlorophylle nécessite un stock d'hème, tout comme la protéine AppA (hémoprotéine). Une hypothèse serait que la protéine TSPO séquestrerait l'hème (ou des intermédiaires de synthèse de l'hème comme la coproporphyrine III ou la protoporphyrine IX)

et empêcherait ainsi la liaison de l'anti-répresseur sur le répresseur, bloquant de ce fait la synthèse de la bactériochlorophylle. Cette régulation n'est que transitoire et permettrait de constituer un stock d'hème suffisant pour mettre en place un système photosynthétique complet et efficace rapidement (**Figure 37**) (Yeliseev and Kaplan, 1995, 1999, 2000; Yeliseev *et al.*, 1997; Zeng and Kaplan, 2001; Batoko *et al.*, 2015).

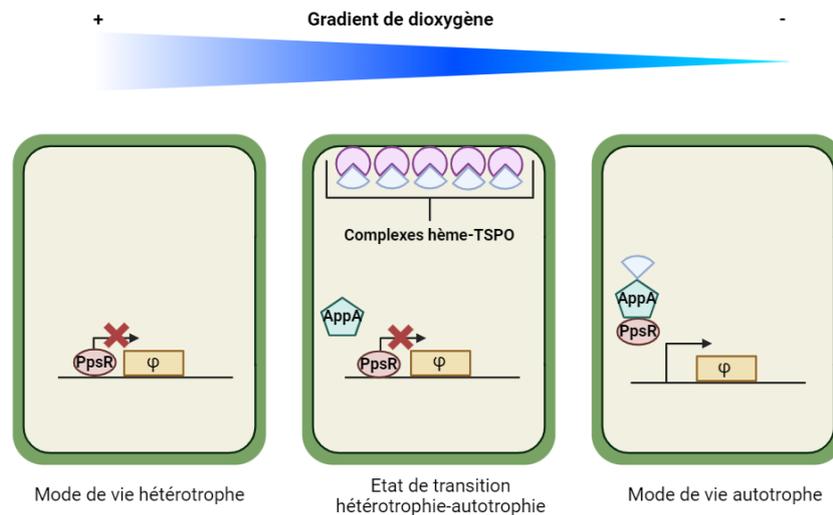


Figure 37. Le rôle de la protéine TSPO chez *R. sphaeroides*. Dans des conditions où la concentration en oxygène est importante, *R. sphaeroides* favorise un mode de vie hétérotrophe basé sur la respiration. Dans ces conditions, les gènes en lien avec la photosynthèse (boîte orange notée φ) sont réprimés par le répresseur PpsR (la croix rouge symbolise la répression de l'expression). Lorsque la concentration en oxygène diminue s'initie alors un état de transition vers un mode de vie autotrophe basé sur la photosynthèse anoxygénique. Cet état est caractérisé par la biosynthèse d'éléments nécessaires comme les photosystèmes et les bactériochlorophylles qui nécessitent un constituant particulier pour leur biosynthèse, l'hème. La quantité d'hème libre dans la cellule est limitée (car génère du stress oxydant). Pour assurer une transition efficace il y a donc production d'une quantité d'hème importante. Cet hème sera séquestré par les protéines TSPO permettant ainsi la création d'un stock sans risque de génération de stress oxydant. La fin de cet état de transition se fait avec l'ajout d'hème sur l'anti-répresseur AppA (hémoprotéine). AppA se lie au répresseur PpsR. La formation du complexe PpsR/AppA permet l'induction de l'expression des gènes en lien avec la photosynthèse et favorise le passage vers un mode de vie autotrophe. Le schéma proposé ici avec un gradient d'oxygène fonctionne également avec une baisse de l'intensité lumineuse.

Chez plusieurs bactéries (*C. tepidum*, *R. sphaeroides* et *B. cereus* notamment) il a été montré que la protéine TSPO participe à la biodégradation des porphyrines (Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015) en fonction de la concentration en oxygène et de la luminosité. Les porphyrines libres dans les cellules sont une source importante de stress oxydant. C'est par exemple le cas de la protoporphyrine IX photo-oxydée qui, pour retourner à un état stable, libère un oxygène singulet (à partir d'une molécule de dioxygène) (**Figure 38**). La production et le recyclage des porphyrines sont hautement régulés par la cellule. TSPO

participerait notamment à la dégradation de la protoporphyrine IX libre en un composé nommé bilidingine (composé apparenté à la biliverdine IX aux propriétés antioxydantes que l'on trouve chez les végétaux) réduisant par conséquent la quantité d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules bactériennes (**Figure 38**). Ce système participe donc à la régulation des porphyrines libres dans la cellule mais semble également être impliqué lors de la transition d'un mode de vie autotrophe vers un mode de vie hétérotrophe chez *R. sphaeroides*. Cette transition impose le recyclage de tous les composés nécessaires à la photosynthèse, certains de ces composés sont riches en hème et porphyrine (Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015).

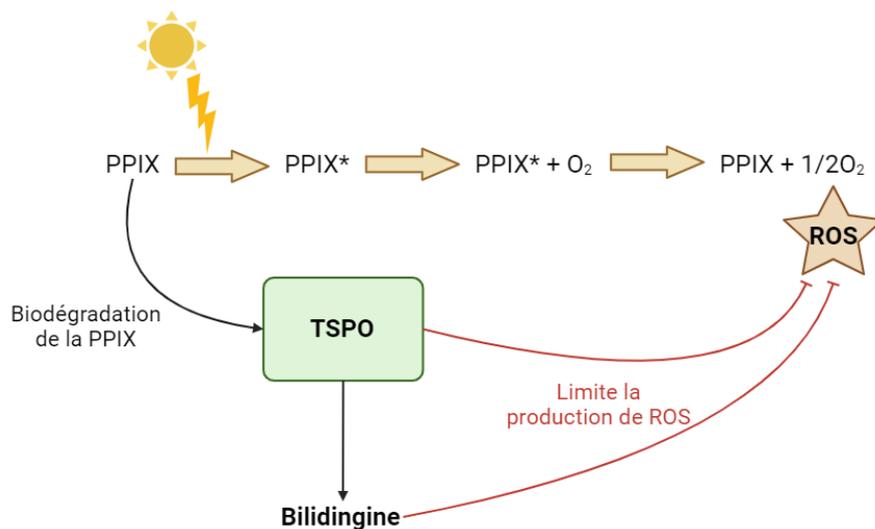


Figure 38. Schéma synthétique de la biodégradation de la protoporphyrine IX (PPIX) médiée par la protéine TSPO. Sous l'action de la lumière, la PPIX est photo-oxydée (PPIX*). Pour retourner à un état stable, PPIX* utilise une molécule de dioxygène et libère un oxygène singulet (1/2O₂). L'oxygène singulet est une espèce réactive de l'oxygène (ROS) participant à la création d'un stress oxydant, toxique pour la bactérie. La biodégradation de la PPIX par la protéine TSPO conduit à la production de la bilidingine (molécule apparentée à la biliverdine IX) aux propriétés antioxydantes présumées (schéma adapté de Senicourt, 2016).

Chez *S. meliloti*, la protéine TSPO est impliquée dans la réponse au stress nutritif. Lorsque le milieu est pauvre en azote et que la teneur en oxygène diminue l'opéron *ndi* (*nutrient deprivation induced*) est induit par la protéine TSPO et par la protéine FixL (senseur à l'oxygène). Ce système semble impliqué dans la mise en place d'une interaction symbiotique entre la bactérie et la luzerne (Davey and De Bruijn, 2000).

Des protéines TSPO ont également été mises en évidence chez les champignons, levures et archées mais leurs rôles restent actuellement inconnus (Fan *et al.*, 2012).

D. Le gène *tspo* et la protéine TSPO dans le genre *Pseudomonas* :

La première séquence TSPO prédite chez le genre *Pseudomonas* est celle de *Pseudomonas fluorescens* SBW28 et présente 50% d'homologie de séquence avec celle observée chez *R. sphaeroides* (Chapalain *et al.*, 2009). Par la suite, elle a été identifiée dans d'autres souches et espèces de *Pseudomonas* mais n'est pas présente chez la bactérie modèle *P. aeruginosa* (Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

La séquence du gène *tspo* de *Pseudomonas* est constituée d'environ 440 nucléotides soit une protéine d'environ 16 kDa (protéine tronquée en C- et N-terminale par comparaison avec la protéine TSPO1 de mammifère). L'environnement génique du gène *tspo* est très variable d'une souche/espèce de *Pseudomonas* à une autre, mais est en général caractérisé par une grande richesse en transposase ce qui suggère une mobilité par transfert de gène. Ce potentiel transfert de gène semble être ancien puisque le contenu en GC du gène *tspo* et des gènes voisins varie très peu. L'expression du gène *tspo* chez *P. fluorescens*, est caractérisée par un premier pic d'expression en début de phase exponentielle de croissance suivie par une rapide chute et une augmentation progressive au cours de la phase exponentielle jusqu'à atteindre un second pic (maximum d'expression) en fin de phase exponentielle. L'expression du gène est régulée par deux facteurs de transcription (AlgU et RpoH) impliqués dans la réponse au stress (osmotique et thermique notamment) chez la bactérie (Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

La structure de la protéine est conservée et possède cinq domaines transmembranaires, un domaine de liaison au peptidoglycane et est prédite pour être ancrée dans la membrane plasmique de la bactérie. Comme chez les autres bactéries, la protéine TSPO de *Pseudomonas* fonctionne sous la forme d'un homodimère. À l'inverse de la protéine TSPO de *R. sphaeroides*, la protéine de *Pseudomonas* est capable d'interagir avec les ligands de la protéine TSPO mitochondriale *via* la première boucle extracellulaire (facilite les études sur sa fonction).

La fonction des protéines TSPO chez *Pseudomonas* n'est pas encore totalement connue. Dans leur étude de 2009, Chapalain et collaborateurs (Chapalain *et al.*, 2009) ont mis en évidence le rôle de cette protéine dans la stimulation de l'adhésion aux surfaces et dans la réduction de la virulence (utilisation de ligands spécifiques de TSPO). Leneveu-Jenvrin et collaborateurs (Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014), quant à eux, ont montré par une approche d'interactomique *in silico*, que les protéines TSPO produites par *P. fluorescens* et *P. syringae* sont en capacité d'interagir avec diverses protéines impliquées dans différents processus

comme : l'homéostasie du fer et le métabolisme des porphyrines (apoferritine), la réponse au stress oxydatif (monothiol glutaredoxine, photolyase, catalase, thiol oxydoréductase), la virulence (hémolysine II/III), la biosynthèse et l'intégrité des membranes cellulaires et de la paroi (UDP-N-acétylmuramate-alanine ligase, porine OprF, adénine phosphoribosyl transférase, *nucleoside-diphosphate-sugar epimerase*) et la transduction du signal (histidine kinase).

Chez tous les organismes étudiés, TSPO semble impliquée (au moins partiellement) dans la détection et la réponse au stress (**Figure 39**) (Fan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016). Considérant son ubiquité, son lien avec la réponse au stress et l'étude antérieure réalisée sur *P. tetraurelia*, le gène *tspo* pourrait alors être caractérisé comme un potentiel biomarqueur lié au stress et notamment au stress pesticide.

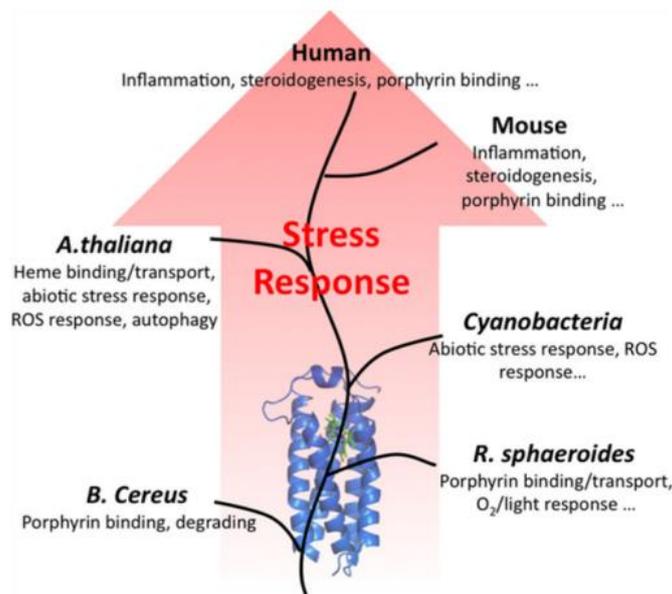


Figure 39. Représentation schématique de l'implication des protéines TSPO dans la réponse au stress chez divers organismes (figure extraite de Li *et al.*, 2016).

*Chapitre n°2 Le volatolome
de l'abeille domestique Apis
mellifera chroniquement
exposée à de faibles doses de
fipronil*

I. Introduction :

Titre :

Mise en évidence par l'approche volatolomique d'un modulateur des récepteurs GABA et de composés sémiochimiques comme candidats biomarqueurs d'une exposition chronique au fipronil chez *Apis mellifera*.

Résumé français :

Parmi les différentes approches « omiques » pouvant être utilisées en toxicologie, la volatolomique, en plein développement méthodologique et technique, ouvre une nouvelle voie pour qualifier de nouveaux biomarqueurs d'exposition ou d'effet aux xénobiotiques. Une étude volatolomique menée sur les bactéries du sol a permis de faire la preuve de concept de son utilisation en toxicologie. Cette approche innovante a été testée sur un nouvel organisme modèle : l'abeille mellifère *Apis mellifera*. La cuticule abdominale, le corps gras et les tissus adhérents à ces structures (abdomens sans le tractus digestif) d'abeilles émergentes élevées dans des conditions contrôlées au laboratoire ont été analysés par volatolomique après 14 et 21 jours d'exposition chronique à 0,5 et 1 µg/L de fipronil. La caractérisation des composés organiques volatiles (COV) a été menée par la méthode HS-SPME/GC-MS. Au total 281 pics ont été extraits. Aucun effet significatif du fipronil n'a été observé sur le volatolome après 14 jours d'exposition chronique. En revanche, une déviation du volatolome est apparue après 21 jours d'exposition. L'étude de cette déviation a permis la mise en évidence de 14 COV dont l'abondance du signal a évolué au cours de l'expérience. Cette approche a conduit à la caractérisation d'un composé (le 2,6-diméthylcyclohexanol) qui, d'après la littérature, peut interagir avec les récepteurs GABA (cible du fipronil) et de COV associés à des activités sémiochimiques (phéromones, répulsifs, composés liés à la glande de Nasonov), témoignant d'un potentiel effet de l'insecticide sur le comportement de l'abeille.

Contexte de l'étude :

La réponse d'un organisme face à un stress donné peut être étudiée par le biais de mécanismes moléculaires associés à ce stress (Hayward, 2014). Les approches « omiques » représentent une alternative aux méthodes toxicologiques traditionnelles basées sur quelques gènes, protéines ou métabolites. Les changements dans le transcriptome, le protéome ou le métabolome d'un organisme peuvent révéler des marqueurs potentiels de l'exposition à un composé toxique (Galloway *et al.*, 2004; Ankley *et al.*, 2006). Lorsqu'un organisme subit un

stress (biotique ou abiotique), son métabolisme est souvent modifié afin de s'adapter aux perturbations ou aux dommages causés par ce stress (Bijlsma and Loeschke, 2005; Hidalgo *et al.*, 2019). Ces ajustements entraînent des changements dans la production de métabolites, tels que les composés organiques volatils (COV). Les COV sont des composés de faible poids moléculaire et sont volatils à température ambiante (20°C) et à faible pression (moins de 10 Pa) (Broza *et al.*, 2015; Giannoukos *et al.*, 2019). Le volatolome est défini comme la fraction volatile du métabolome à un moment donné dans un environnement donné (Broza *et al.*, 2015). Les COV peuvent témoigner d'une réorganisation du métabolisme et apparaissent donc comme des marqueurs potentiels de l'exposition au stress (Ratel *et al.*, 2022).

Le fipronil, insecticide neurotoxique (introduit dans de nombreuses formulations commerciales), est caractérisé par un spectre toxique large contre des insectes jugés nuisibles (puces, tiques, sauterelles, ...). Il présente également un spectre toxique large contre des organismes non-cibles et notamment sur des invertébrés d'intérêt agronomique (Gibbons *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2016). L'abeille domestique, *Apis mellifera*, est un insecte pollinisateur majeur (participe à la production de plus de 30 % des aliments consommés par l'Homme). Cependant, un déclin de sa population a été observé, en Europe et en Amérique du Nord, depuis une trentaine d'années (VanEngelsdorp and Meixner, 2010). L'abeille mellifère est également reconnue comme étant un indicateur sensible des perturbations environnementales. Elle constitue un excellent organisme modèle en toxicologie en raison de son rôle d'auxiliaire des écosystèmes et des nombreuses voies par lesquelles elle peut être contaminée par des pesticides (Johnson, 2015). Le fipronil est un antagoniste non-compétitif des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique. La liaison du fipronil sur son récepteur cible entraîne une inhibition des flux d'ions chlorure dans les cellules nerveuses ce qui, à termes, conduit à la mort des abeilles exposées (Casida and Durkin, 2013; Johnson, 2015). Le fipronil est donc considéré comme un insecticide neurotoxique systémique extrêmement toxique pour les abeilles (DL₅₀ de 4,2 ng/abeille à 48h en cas d'intoxication orale) (Pisa *et al.*, 2015). Néanmoins, à des doses plus faibles, de nombreux effets sublétaux ont également été démontrés à différents niveaux physiologiques, tels que des impacts sur la reproduction (Kairo *et al.*, 2016, 2017), le développement (Zaluski *et al.*, 2015), l'activité de butinage (Colin *et al.*, 2004) et l'expression des gènes de l'immunité (Aufavre *et al.*, 2014).

Hypothèse de travail :

La principale hypothèse à la base de cette étude considère que lorsqu'un organisme est soumis à un stress (ici un stress pesticide) il se produit une cascade d'évènements à différentes échelles biologiques (moléculaire, cellulaire, tissulaire, ...). Cette cascade comprend l'identification du stressor par des senseurs, l'action du stressor en lui-même et la mise en place de la réponse de l'organisme ayant pour objectif le retour à son état « de base ». On assiste alors à une réorganisation du métabolisme, à l'échelle moléculaire notamment, que ce soit *via* l'expression des gènes, la biosynthèse de protéines ou de métabolites. Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser la déviation du métabolome volatil (volatolome) associée à l'exposition chronique à de faibles doses de fipronil par comparaison avec un organisme non-exposé afin de mettre en évidence de potentiels composés marqueurs de l'exposition à l'insecticide.

Objectifs de l'étude :

Trois principaux objectifs ont été ciblés dans cette étude :

- 1- Poursuivre la preuve de concept initiée par Hidalgo et collaborateurs (Hidalgo *et al.*, 2019) visant à promouvoir l'utilisation de l'approche volatolomique en (éco)toxicologie comme outil pertinent dans la recherche de potentiels marqueurs d'exposition à des xénobiotiques en utilisant un nouvel organisme modèle : l'abeille mellifère *A. mellifera*;
- 2- Mettre en évidence la déviation du volatolome (en utilisant la cuticule, le corps gras et les tissus adhérents) chez l'abeille domestique *A. mellifera* dans le cas d'une exposition chronique par voie trophique à de faibles doses de fipronil;
- 3- Détecter et identifier des composés volatils marqueurs de cette exposition.

II. Article :

Fernandes, V.; Hidalgo, K.; Diogon, M.; Mercier, F.; Angénieux, M.; Ratel, J.; Delbac, F.; Engel, E.; Bouchard, P. A GABA Receptor Modulator and Semiochemical Compounds Evidenced Using Volatolomics as Candidate Markers of Chronic Exposure to Fipronil in *Apis mellifera*. *Metabolites* 2023, 13(2), 185. <https://doi.org/10.3390/metabo13020185>

A GABA Receptor Modulator and Semiochemical Compounds Evidenced Using Volatolomics as Candidate Markers of Chronic Exposure to Fipronil in *Apis Mellifera*

Vincent Fernandes¹, Kevin Hidalgo^{1,2}, Marie Diogon¹, Frédéric Mercier², Magaly Angénieux², Jérémy Ratel², Frédéric Delbac¹, Erwan Engel^{2*} and Philippe Bouchard^{1*}.

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²INRAE, UR370 Qualité des Produits Animaux, MASS group, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Abstract

Among the various “omics” approaches that can be used in toxicology, volatolomics is in full development. A volatolomic study was carried out on soil bacteria to validate the proof of concept, and this approach was implemented in a new model organism: the honeybee *Apis mellifera*. Emerging bees raised in the laboratory in pain-type cages were used. Volatolomics analysis was performed on cuticles, fat bodies, and adhering tissues (abdomens without the digestive tract), after 14 and 21 days of chronic exposure to 0.5 and 1 µg/L of fipronil, corresponding to sublethal doses. The VOCs analysis was processed using an HS-SPME/GC-MS method. A total of 281 features were extracted and tentatively identified. No significant effect of fipronil on the volatolome could be observed after 14 days of chronic exposure. Mainly after 21 days of exposure, a volatolome deviation appeared. The study of this deviation highlighted 11 VOCs whose signal abundances evolved during the experiment. Interestingly, the volatolomics approach revealed a VOC (2,6-dimethylcyclohexanol) that could act on GABA receptor activity (the fipronil target) and VOCs associated with semiochemical activities (pheromones, repellent agents, and compounds related to the Nasonov gland) leading to a potential impact on bee behavior.

Keywords : volatolomics; volatile organic compounds; pesticide; GABA modulator; honeybee

Introduction

Toxicology characterizes toxic compounds, studies how they act on organisms, and assesses the associated risks ([1]). An organism's response to a given stress can be understood by studying the biological mechanisms associated with a disturbance ([2]). "Omics" approaches represent an alternative to traditional toxicological methods based on a few genes, proteins, or metabolites. Changes in the transcriptome, proteome, or metabolome of an organism may reveal potential markers of exposure to a toxic compound ([3–5]). When an organism undergoes stress (biotic or abiotic), its metabolism is often modified in order to adapt to disturbances or damages ([6,7]). These mechanistic adjustments result in changes in metabolite production, particularly metabolism end products such as Volatile Organic Compounds (VOCs). VOCs are low-molecular-weight compounds and are volatile at room temperature (20 °C) and low pressures (below 10 Pa) ([8,9]). The volatolome is defined as the volatile fraction of the metabolome at a given time in a given environment ([8]). VOCs can attest to a reorganization of metabolism and thus appear as potential markers of stress exposure ([10]). Searching for markers using volatolomics has already been tested in previous work on livestock ([10–13]), soil bacteria ([7]), and gut microorganisms ([14,15]).

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)-phenyl]-4-trifluoromethylsulfinyl-1H-pyrazole-3-carbonitrile) is an insecticide of the phenylpyrazole family ([16]). It has been introduced in many commercial formulations used in agriculture, veterinary medicine, and as a domestic insecticide. It has a broad toxic spectrum against organisms considered pests such as ants, fleas, ticks, grasshoppers, and locusts. However, in 2004, several products for agricultural use containing fipronil were banned in France (Regent® in particular) owing to the uncertain effects of this substance on humans and the deleterious effects observed in mammals (disturbances of neuronal, hepatic, renal, and thyroid functions) ([17,18]). In addition, it has been reported that fipronil has a broad toxic spectrum on vertebrate non-target organisms (such as small mammals, birds, fishes, and amphibians) and on invertebrate ecosystem auxiliaries (such as bees, butterflies, and earthworms) (see ([19,20]) for a review). Nevertheless, fipronil is still authorized for domestic use and veterinary medicine.

The honeybee, *Apis mellifera*, is a major pollinator insect and participates in the production of more than 30% of the food consumed by humans. However, a decline in its population has been observed, in Europe and North America in particular, over the past three decades ([21]). For many years, the honeybee has also been recognized as a sensitive indicator

of environmental disturbances. It is an excellent model organism in toxicology due to its role as an ecosystem auxiliary and because there are many routes by which its contamination by pesticides can occur (exposure by contact during spreading, during foraging activities, by contact between bees in the hive, through contaminated food, etc.) ([22]). The effects of many toxic compounds including fipronil have been studied in *A. mellifera*. Fipronil is a non-competitive antagonist of γ -aminobutyric acid receptors (also known as GABA-R), and when it binds to these receptors, the flow of chloride ions is blocked in the nerve cells, resulting in hyperexcitability of the nervous system and leading to death ([22–24]). This property makes fipronil a systemic insecticide highly lethal to bees, with an LD50 of 4.2 ng/bee at 48 h in the case of oral intoxication ([19]). Nonetheless, at lower doses, many sub-lethal effects have also been demonstrated at various physiological levels, such as impacts on reproduction ([25,26]), development ([27]), foraging activity ([28]), and the expression of immunity genes ([29]). Sub-lethal effects have also been recorded on the intestinal microbiota structure ([30]) as well as on the establishment of intestinal dysbiosis ([31–33]).

Only a few studies have used volatolomics to assess the impact of a toxic compound on a living organism. It has been assumed that when a bee undergoes pesticide stress, its metabolism is reorganized. This metabolic deviation (focused on VOCs) should allow us to identify potential markers of exposure. This work set out to (i) continue the proof of concept ([7]), which seeks to promote the volatolomics approach as a relevant tool in the search for xenobiotic exposure markers, (ii) highlight a volatolome deviation following chronic fipronil exposure, and (iii) detect volatile markers that could attest to this exposure. The *A. mellifera* volatolome was analyzed after 14 and 21 days of chronic fipronil exposure in bee abdomens cleared of the digestive tract, and so mainly composed of the cuticle and fat body (i.e., tissues considered to be VOC accumulative compartments), using an HS-SPME/GC-MS approach.

Materials and Methods

2.1. Sampling of honeybees.

The experiment was designed based on previous work demonstrating the impact of an intestinal parasite (*Nosema ceranae*) and fipronil on oxidative balance in bee intestines ([33]). Briefly, frames were collected from 3 colonies of the same apiary (UMR 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France) and placed in the dark at 35 °C and 60% relative humidity. Emergent bees were collected on the frame and randomly distributed in 36

pain-type cages with 50 bees/cage. The bees were fed ad libitum with sucrose syrup complemented with 1% nutritional supplement Provitabee® (Biové Laboratory, Arques, France). To mimic the hive environment, a small piece of PseudoQueen® (Contech Enterprises, Inc., Victoria, BC, Canada) was placed in each cage. The encaged honeybees were then placed in an incubator at 33 °C and 60% relative humidity. A total of 3 experimental conditions, 12 cages/condition, were set up 3 days after emerging: a non-exposed group (control), a 0.5 µg/L fipronil-exposed group (Fip 0.5), and a 1 µg/L fipronil-exposed group (Fip 1). These fipronil concentrations were traditionally used in the laboratory as sublethal doses.

2.2. Insecticide exposure and artificial rearing.

A stock solution of fipronil (70 g/L) (PESTANAL®, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich), giving a final concentration of 0.005% DMSO in the feeding syrup. From the beginning of the intoxication with fipronil, the control group was fed with sucrose syrup containing 0.005% DMSO. In the feeding syrups of the Fip 0.5 and Fip 1 conditions, fipronil solution was added to obtain the respective final concentrations of 0.5 µg/L and 1 µg/L.

After 14 days of experimental rearing, bees from 5 cages (for each condition), were sacrificed for the first volatolome analysis. At the end of the experiment, after 21 days of artificial rearing, bees from the 7 remaining cages for each condition were sacrificed for the second volatolome analysis. These 2 sampling points were chosen in accordance with studies previously performed in the laboratory attesting that (i) an increase in mortality appears mainly after 14 days of chronic exposure to fipronil and (ii) bees have a lifespan of about 30 days. The end of the experiment must be set before an excessive increase in natural mortality; 21 days was therefore chosen as a reasonable experimental timeframe.

Mortality was scored daily, and dead bees were removed. Syrup consumption was measured by weighing the feeders containing the nutrient solution every two days.

2.3. Volatolomic analysis.

After 14 and 21 days of experimental rearing, the bees were put to sleep using carbon dioxide. For each experimental condition, five bees were randomly sampled from each pain-type cage and dissected to recover their abdomens. Part of the digestive tract was removed (ventricle, ileum, and rectal bulb) by pulling on the sting. The empty abdomens were immersed in liquid nitrogen immediately after sampling and stored at -80 °C. Each sample represented a pool of five abdomens. A total of 4–5 samples per experimental condition (i.e., 6 modalities, 3

exposure concentrations, and 2 exposure durations for a total of 145 bee abdomens) were prepared. The abdomen was chosen for this experiment because it contains most of the insect's fat body, where many metabolic activities take place, including detoxication activities.

Bee abdomens were ground in liquid nitrogen into a fine homogeneous powder using a stainless-steel ball mill (Retsch, Mixer Mill MM200, 2 min at 30 freq/s). About 140 mg of bee abdomen powder was placed in a 10 mL glass vial (Supelco, Sigma-Aldrich) and supplemented with a saturated saline solution (NaCl) at 360 g/L according to the sample weight ($V = \text{sample weight}/360$) to facilitate Volatile Organic Compound trapping. Vials were then sealed under nitrogen flow with magnetic caps with PTFE/silicone septa (Supelco, Sigma-Aldrich) and left for 24 h at 4 °C. VOCs of *A. mellifera* were analyzed using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) adapted from Bouhlef et al., 2018 ([13]). Briefly, the following steps were carried out with an automated sampler (AOC-5000 Shimadzu): (i) preheating of the samples at 40 °C for 10 min in the agitator (500 rpm) and (ii) SPME trapping (with 65 µm of polydimethylsiloxane/divinylbenzene, a 24-gauge needle, and Supelco) of the VOCs for 30 min.

After extraction, thermal desorption was performed at 280 °C for 2 min in the GC inlet. VOC analysis was performed using a GC/MS-full scan (GC2010; QP2010+, Shimadzu, Japan). VOCs were injected in splitless mode into an Rxi®-624Sil MS capillary column (60 m × 0.25 mm × 1.4 µm; Restek) with helium as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The oven temperature was held at 40 °C for 5 min, ramped up to 230 °C at 3 °C/min, and held at 230 °C for 10 min. The temperature of the transfer line between GC and MS was set at 230 °C. The temperature was set at 180 °C in the MS source and 150 °C in the MS quadrupole. Electron impact energy was set at 70 eV, and data were collected in the range m/z 33–250 at 10 scans per second.

Peak areas of the VOCs were integrated from the SPME-GC-MS signals using a mass fragment selected for being both specific to the sought-after molecule and free of any coelution with a home-made automatic algorithm developed by Bouhlef et al., 2018 ([13]) using Matlab R2017 (The Math Works, Natick, NC, USA). VOCs were tentatively identified from mass spectra via comparison against the NIST 17 mass spectral library (version 1.3, build 4 May 2017) and from retention indices (RI) via comparison with published RI values and those of our internal database. To calculate the experimental RI, a standard alkane solution (Supelco, Sigma-Aldrich) was analyzed with SPME-GC-MS at the end of the analytical campaign.

The fipronil solutions used to prepare the Fip 0.5 and Fip 1 sucrose solutions were also analyzed with the same SPME-GC-MS method to determine whether any of the discriminating VOCs originated from the exposure solution (exogenous compounds).

2.4. Data treatment.

2.4.1. Consumption and survival monitoring.

Survival and consumption data were analyzed with R software (version 2.1.4, <http://www.R-project.org>, accessed since January 2021). Mortality data were used to build Kaplan–Meier distributions on which a Cox–Mantel test was performed. A Shapiro–Wilk test followed by a Student’s t-test was applied to the consumption data.

2.4.2. Volatolome analysis.

Volatolome data were processed using Statistica (version 12, StatSoft) and R (version 2.1.4) software. A multivariate ANOVA (MANOVA) was performed to observe whether fipronil influenced the bee volatolome. After a Shapiro–Wilk test, discriminant VOCs were identified with a one-way ANOVA. ANOVAs were followed by a Newman–Keuls post hoc procedure among levels of significant factors to detect the origin of the significant differences (a compound was considered discriminant when its signal abundance was significantly different in a certain case/control comparison for a specific exposure duration). A principal component analysis (PCA) was conducted using discriminant VOCs to show the structures of the volatolomic profiles for the six experimental conditions.

Results

3.1. Effect of fipronil exposure on survival and sucrose consumption.

The survival analysis (**Figure 1**) showed a 10% decrease in the survival rate for the control condition over the experimental period. For Fip 0.5, a 28% decrease in the survival rate was observed over the 21 days, while a 68% decrease in the survival rate was found for the Fip 1 group. For this condition, a maximum decrease of 14% was observed between day 13 and day 14. It was in this period that we observed a marked disparity between the Fip 1 distribution and the Fip 0.5 and control distributions. Indeed, for the Fip 1 condition, there was a strong decrease in the survival rate after the first 14 days of treatment. What was observed on the survival curves was confirmed with a Cox–Mantel test (p -value < 0.05) and could be determined between each

survival distribution. Fipronil, at the doses tested with chronic exposure in the experiment, therefore had a significant impact on the survival of *A. mellifera*.

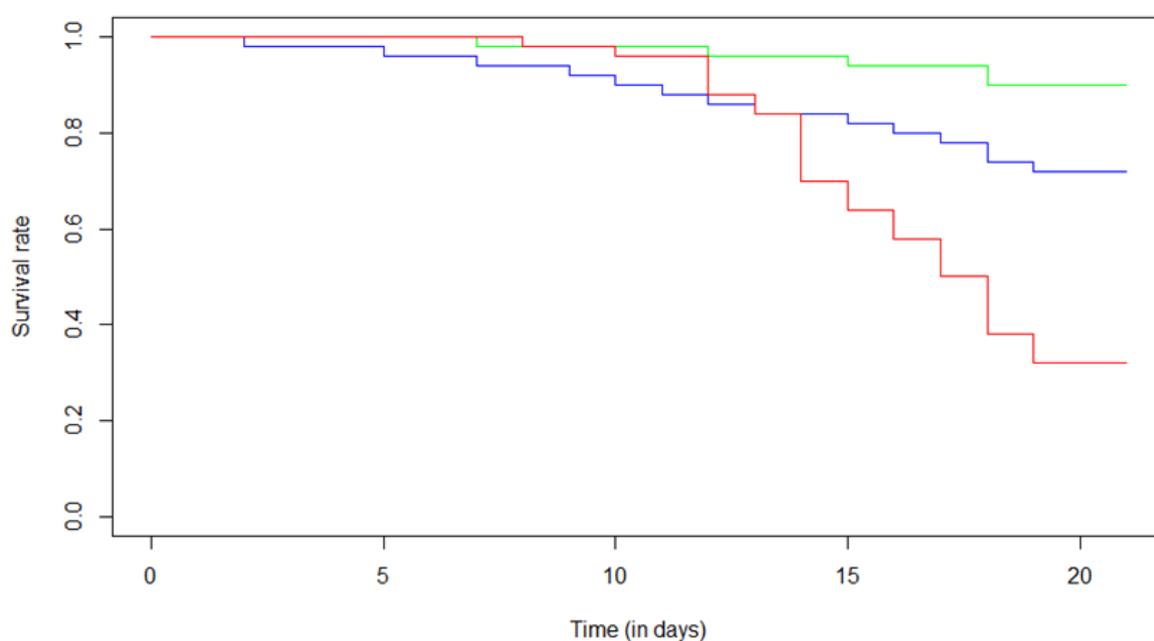


Figure 1. Effect of chronic exposure at different fipronil concentrations on the survival of *A. mellifera*. The Kaplan-Meier distributions shows the survival proportions of bees (i) not exposed to fipronil (control, green line), (ii) exposed to 0.5 µg/L of fipronil (Fip0.5, blue line), and (iii) exposed to 1 µg/L of fipronil (Fip1, red line). The Cox-Mantel test shows a significant decrease in survival of bees exposed to both fipronil concentrations compared with the control group (p -value = 0.020 for Fip0.5 and p -value < 0.0001 for Fip1). In addition, a significant difference was observed between the two exposed groups (p -value = 0.0003).

An average daily intake of 35 mg of sucrose/bee/day was observed for the control group, 32 mg of sucrose/bee/day for the Fip 0.5 group, and 31 mg of sucrose/bee/day for the Fip 1 group (**Figure 2**). Bees consumed 0.013 ng of fipronil/bee/day (LD50/323) and 0.026 ng of fipronil/bee/day (LD50/161) for the Fip 0.5 and Fip 1 groups, respectively (the data are not shown). At the end of the experiment, the fipronil consumption was still below the LD50, with a mean cumulated consumption of 0.273 ng/bee (LD50/15.4) for the Fip 0.5 group and 0.546 ng/bee (LD50/7.7) for the Fip 1 group. No significant effect of the treatments on consumption was observed based on the Student's t -test (p -value > 0.05). Chronic fipronil exposure did not, therefore, affect the daily food intake of *A. mellifera*.

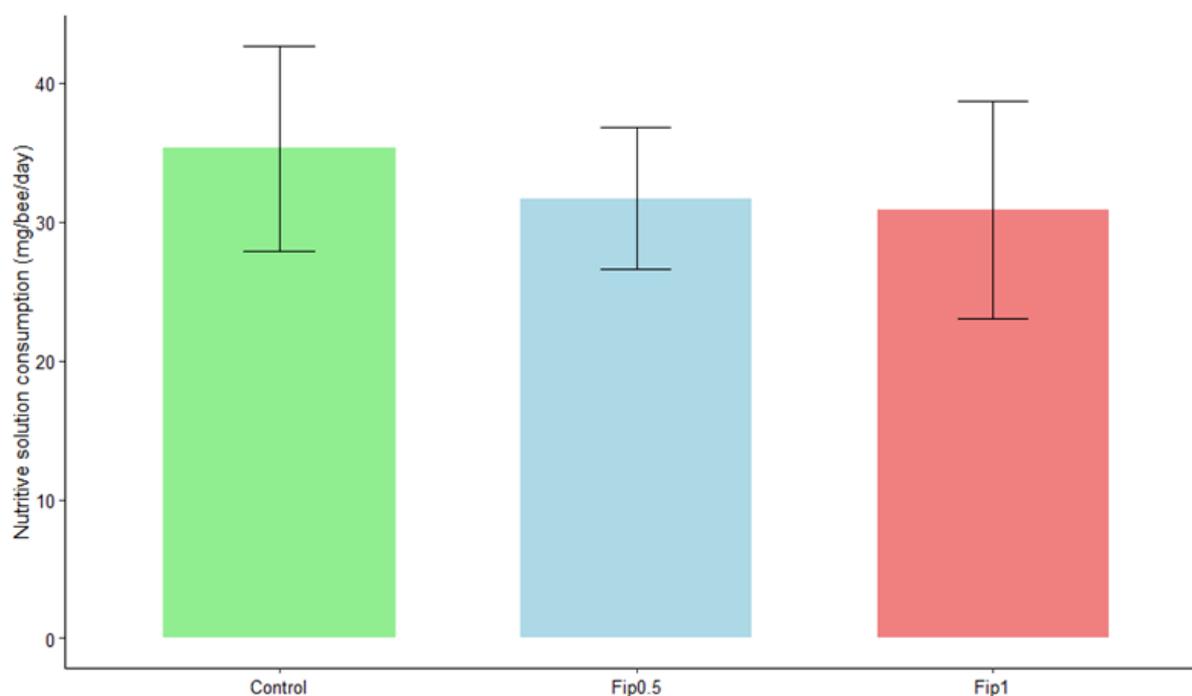


Figure 2. Average daily consumption by bees of 50% sucrose solution under different conditions. Statistical analysis with Student’s *t* test did not show a significant effect of fipronil on daily sugar consumption between the different conditions (*p*-value > 0.05).

3.2. Volatolome analysis of *A. mellifera* exposed to fipronil.

In all, 281 features were extracted in this study and treated with a MANOVA. It showed a significant effect of fipronil concentration, the duration of treatment, and the interaction between these two experimental factors on the *A. mellifera* volatolome (*p*-values < 0.05, **Table 1**). Among the features, fourteen were tentatively identified because they were considered discriminant according to a one-way ANOVA and Newman–Keuls post hoc procedure (their signal abundance was modulated in at least one case/control comparison for a specific exposure duration, as shown in **Table 2**). Three unidentified compounds (among the fourteen mentioned above) showed a significantly modulated signal abundance.

Table1. Results of the MANOVA.

Factor	Df	F-Value	<i>p</i> -Value
Concentration	2	6.24	0.005
Treatment duration	1	25.89	0.01
Concentration × Treatment duration	2	8.16	0.002

Table 2. VOCs whose signal abundance was significantly modulated in *A. mellifera* after 14 or 21 days of chronic exposure to fipronil. The putative identity is based on the comparison of the results obtained with the GC-MS Solution software (version 4.11 SU2, Shimadzu) and the AMDIS (Automated Mass-Spectral Deconvolution and Identification System) software (version 2.72) of the National Institute of Science and Technology (NIST). The retention times (RT) indicated correspond to those obtained with the GC column Rxi®—624Sil MS fused silica column (60 m × 0.25 mm × 1.4 μm, Restek). The mass/charge ratios (*m/z*) correspond to the mass fragments used for area determination. The RI NIST values correspond to the retention indices reported with a D85 capillary column in the NIST database. The function proposed for each molecule is based on searches in bibliographic databases and in specialized databases such as The Pherobase, which is specialized in compounds with semiochemical activities (<https://www.pherobase.com/>, accessed since January 2021).

Putative Identity	<i>m/z</i>	RT	RI NIST	RI Calculated	Proposed Function
2,6dimethylcyclohexanol	71	40.8	1112	1133	Positive modulator of GABA receptors
1-nonen-3-ol	55	38.5	1078	1079	Repellent agent
9-decenol	55	44.5	1256	1261	
2-decen-1-ol	57	45.0	1285	1285	Pheromones and alarm pheromones
2-heptanone	43	27.0	891	898	
3-nonanone	43	38.9	1087	1087	
Farnesol	69	54.1	1713	NA	Compounds related to the Nasonov gland
Geranyl acetone	69	48.0	1460	1455	
Neric acid	69	45.5	1340	1312	
Geranic acid	69	46.1	1345	1345	
6-methyl-5-hepten-2-one	43	32.0	986	985	

Based on discriminant VOCs, a PCA was built (**Figure 3**) to visualize the structuring of the dataset. The first PCA axis (PC1) accounted for 59.5% of the dataset inertia and showed a separation between the Fip 1 group at 21 days and the other experimental conditions. The second PCA axis (PC2) explained 15.6% of the dataset inertia and showed a separation between the control and Fip 0.5 groups at 21 days and the group containing all conditions after 14 days of exposure. No separation was observed between the 3 experimental conditions at 14 days, so there was little or no difference in the volatolomic profiles after 14 days of treatment. There was little difference between the volatolomic profiles of the control and Fip 0.5 groups at 21 days, but a trend was discernable because Fip 0.5 was slightly out of step with the control group. On the other hand, the Fip 1 group at 21 days stood out clearly from these other 2 conditions. This suggests that there is an exposure threshold below which the overall volatolomic response is not yet significant.

The correlation circle (**Figure 4**) based on the fourteen discriminant VOCs and boxplots (**Figures 5 and 6**) representing the evolution of signal abundance separate the compounds into two clusters: (i) those whose signal abundance evolves with fipronil concentrations (in

particular with the Fip 1 condition at twenty-one days) and (ii) those whose signal abundance may evolve with the exposure duration. The eleven discriminant VOCs identified (excluding the three unknown compounds) in bees exposed to fipronil could also be divided into four different groups according to their putative functions (**Table 2**)

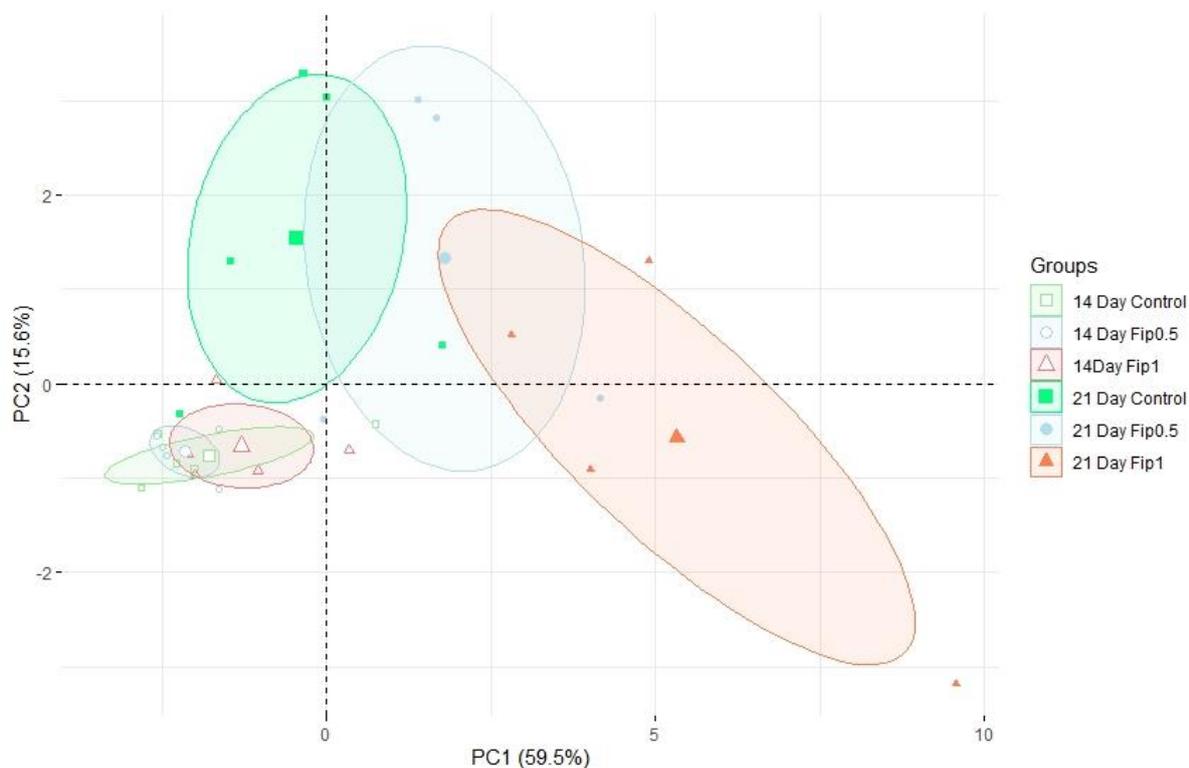


Figure 3. Normed PCA showing the volatolomic profiles in *A. mellifera* exposed or not to different fipronil concentrations. For each of the 6 conditions, 4-5 pools of 5 abdomens were analyzed. For each group, the large icon (specific to each group) represents the barycenter of the group. The ellipses are 95% confidence ellipses, which means that in 95% of cases, a point belonging to a group will be found inside the ellipse of that group.

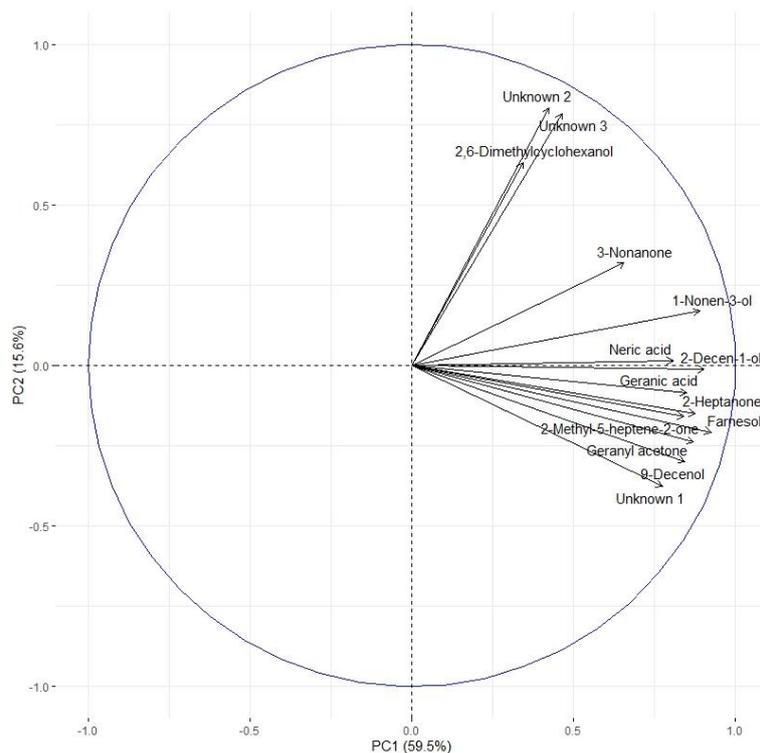


Figure 4. Correlation circle based on the 14 discriminating VOCs. Two clusters can be identified. The first contains 11 of the 14 discriminating VOCs. The second one contains three compounds (2,6-dimethylcyclohexanol and unknown compounds 2 and 3). Considering the evolution of the signal abundance, the first cluster can be related to the fipronil exposure and the second cluster to the exposure duration.

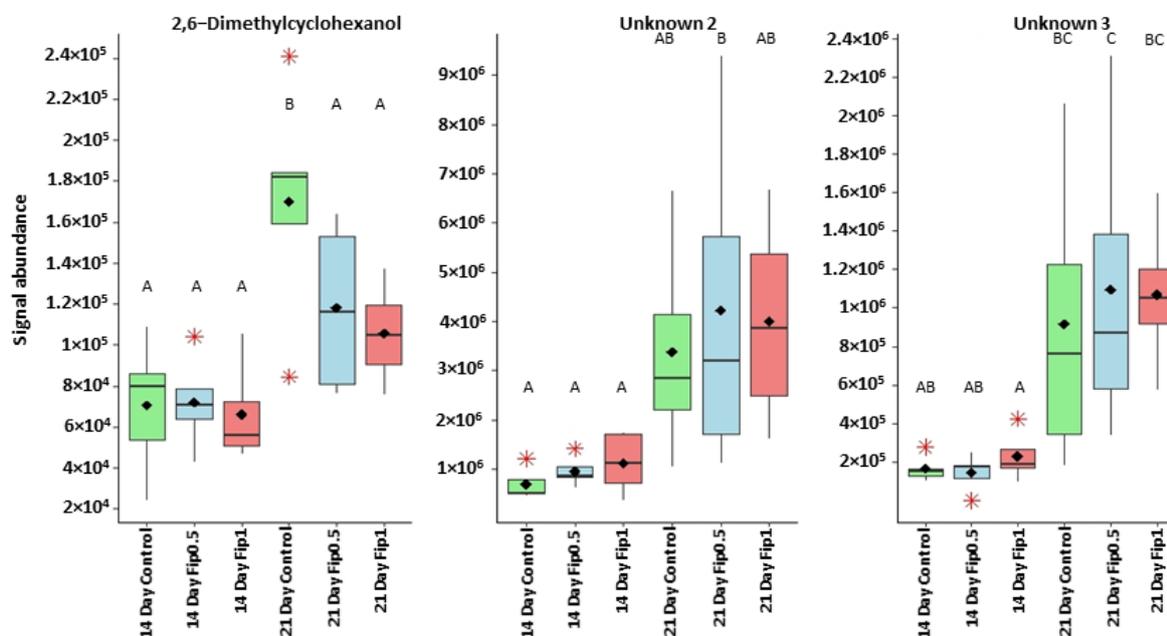


Figure 5. Boxplots representing discriminant compounds whose signal abundance increases with treatment duration irrespective of fipronil concentration. Black diamonds represent the average signal abundance of each group. The black horizontal crossbars represent the medians. Red asterisks represent outlier values. Differences in signal abundance are represented by letters. When 2 conditions are characterized by the same letter, there is no significant difference between them (p -value > 0.05, according to a Newman–Keuls test).

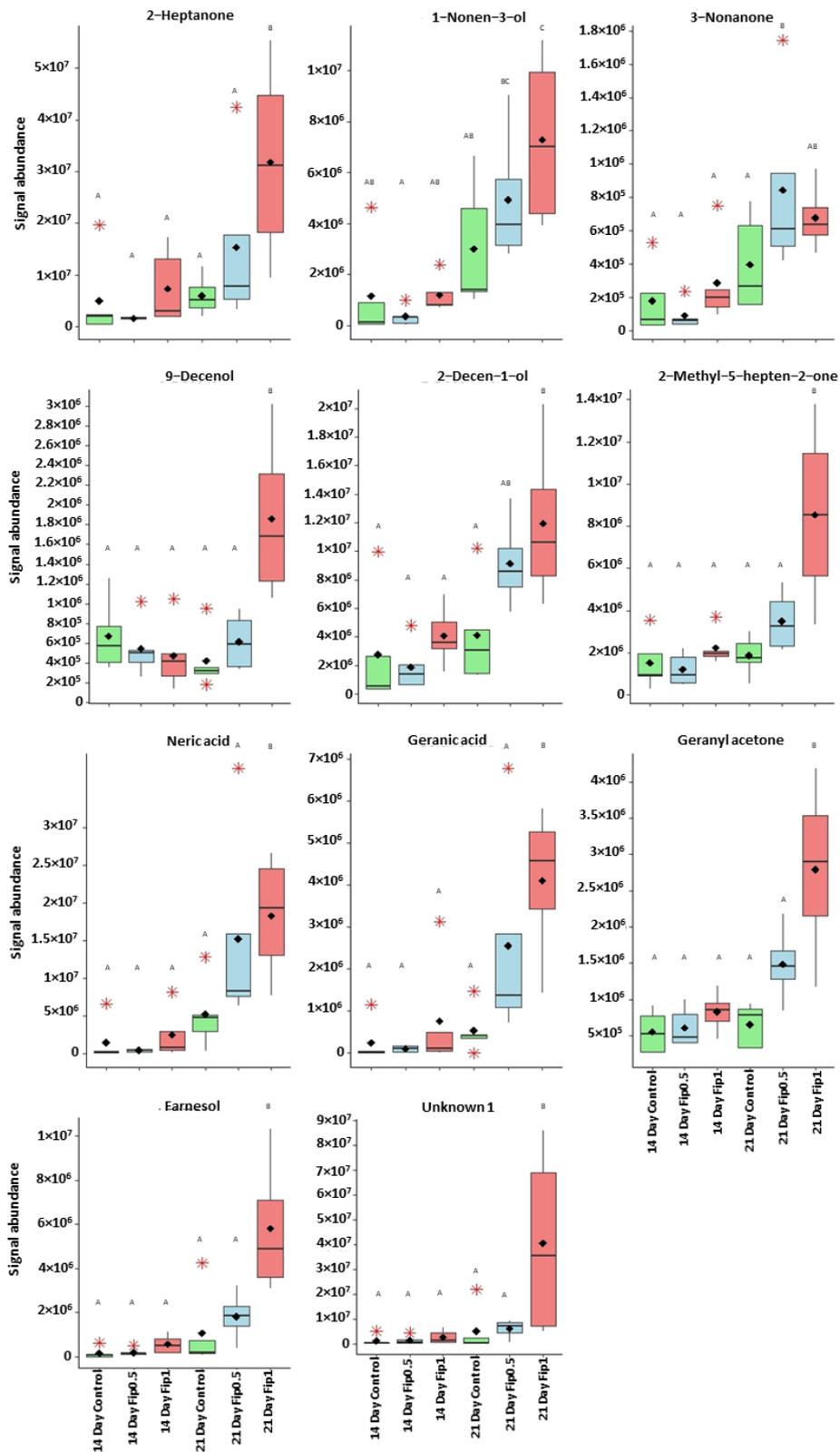


Figure 6. Boxplots representing discriminant compounds whose signal abundance increased with fipronil concentration. Black diamonds represent the average signal abundance of each group. The black horizontal crossbars represent the medians. Red asterisks represent outlier values. Differences in signal abundance are represented by letters. When 2 conditions are characterized by the same letter, there is no significant difference between them (p -value > 0.05 , according to a Newman–Keuls test).

Discussion

Fipronil is a systemic insecticide acting on the gamma-aminobutyric acid receptor (GABA-R) leading to the closure of chloride channels and a persistent nerve signal. Among the identified VOCs, 2,6-dimethylcyclohexanol is described in the literature as a GABAR modulator ([34]). This compound binds to GABA-R on a different binding site than GABA and via an allosteric effect causes a prolonged opening of chloride channels. We can assume that this VOC acts as a modulator produced by the organism to offset or to counteract the fipronil effects. The signal abundance of this compound evolves in the presence of fipronil after 21 days of exposure. These results suggest that there is a potential modulation of GABA-R. This detected VOC could thus be considered a potential biomarker of neural disturbance resulting from exposure to fipronil. In this study, we worked on VOCs arising from the abdominal cuticle and fat body. However, 2,6-dimethylcyclohexanol is a neurotropic compound. In each sample preparation, the intestinal tract was removed to keep the fat body and abdominal cuticle, but the abdominal neural ganglia chain (attached to the inner side of the cuticle) was preserved. This VOC was probably not extracted from the cuticle or fat body but was produced and/or stored in the abdominal nerve ganglia.

The presence of xenobiotics in the close environment of an organism causes stress. In social organisms, it results in metabolism modulations and/or the production and dissemination of intra- or interspecific communication molecules that cause a change in the behavior of neighboring organisms. These kinds of molecules are called semiochemical compounds. In this work, 10 discriminant compounds could be related to pheromones, alarm pheromones, repellent agents (allomones), or molecules related to the Nasonov gland (this is located under the abdominal cuticle in the dorsal position and plays a role in orientation and swarming). 1-nonen-3-ol and 9-decenol are described in the literature ([35]) as repellent agents. In this study, their signal abundance evolved according to the fipronil exposure at 1 $\mu\text{g/L}$ at 21 days. Three VOCs (2-decen-1-ol, 2-heptanone, and 3-nonanone) are described as alarm pheromones or pheromones in some Hymenoptera and beetles ([36–42]), whose signal abundance changed under a Fip 1 condition at 21 days. Five VOCs (farnesol, geranyl acetone, nerolic acid, geranic acid, and 6-methyl-5-hepten-2-one) are described as molecules related to the Nasonov gland in *A. mellifera* (**Figure 7**) ([43–45]) or citral degradation [46]. In this study, their signal abundance changed with fipronil exposure at 21 days. It is interesting that an almost complete Nasonov metabolic pathway scheme could be reconstructed from volatolome data. It highlights

molecules with semiochemical activities (nerolic acid, geranic acid, and farnesol) and some synthesis or degradation intermediates (geranyl acetone and 6-methyl-5-hepten-2-one). These compounds may then be placed in a metabolic context indicating that fipronil exposure is associated with the role of the Nasonov gland (i.e., behavioral fitness).

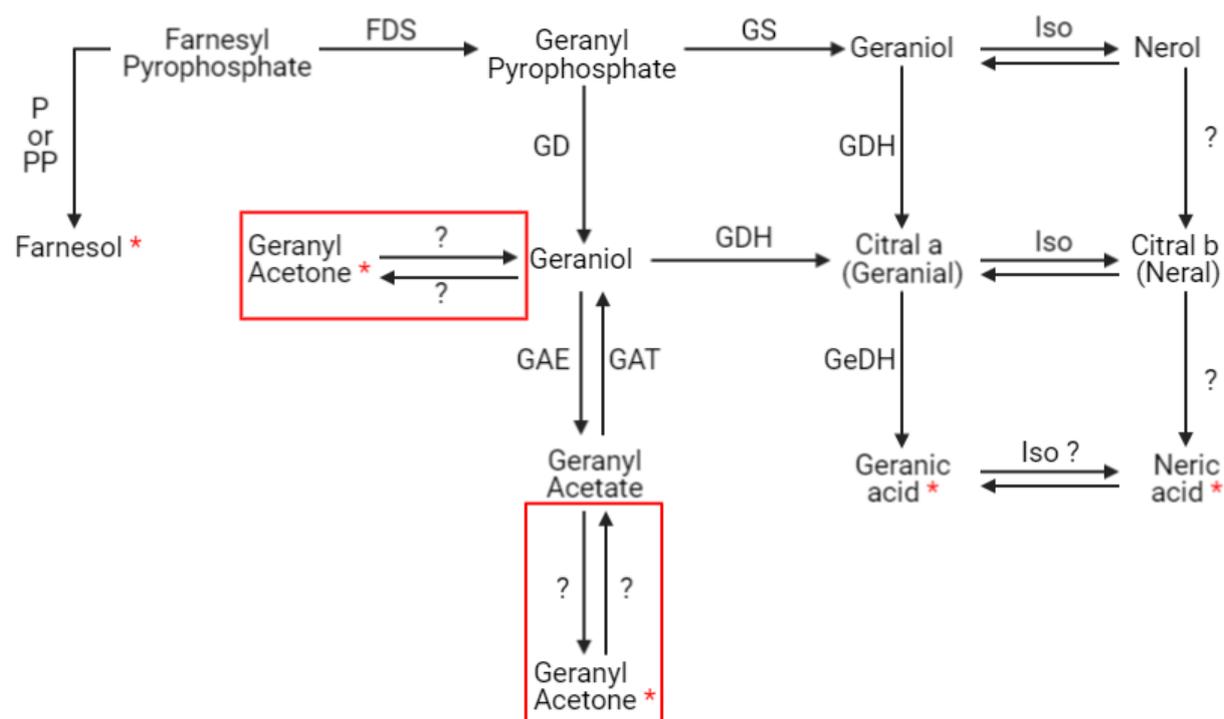


Figure 7. Putative Nasonov gland metabolic pathway. Seven compounds produced in the Nasonov gland are known to have semiochemical activities: farnesol, geraniol, nerol, geranial, neral, geranic acid, and neric acid. Question marks represent hypothetical transformations. Red frames containing geranyl acetone represent these two hypothetical synthesis pathways. P = phosphatase, PP = pyrophosphatase, FDS = farnesyl diphosphate synthase (or farnesyl pyrophosphate synthase), GD = geranyl diphosphatase (or geranyl pyrophosphatase), GAE = geranyl acetate esterase, GAT = geranyl acetyl transferase, GS = geraniol synthase, GDH = geraniol dehydrogenase, Iso = isomerase, and GeDH = geranial dehydrogenase (according to [43–45,47–49]). Red stars represent compounds related to the Nasonov gland pathway identified in the volatolome analysis.

This prospective analysis of the role and origin of VOCs shows that chronic fipronil poisoning alters the exchange of information between organisms. It is therefore necessary to link these results to behavioral and social observations in bees. Further experiments on colonies exposed or not to fipronil could study general bee behavior (aggressiveness, orientation, flight time, and foraging activity) and define the link between the VOCs identified here and bee behavior. As in the case of the neurotropic VOC, not all these semiochemical compounds seem to come from the abdominal cuticle or fat body; some come from various subcuticular glands (the Nasonov gland in particular) that could not be removed during sample preparation.

The great majority of VOCs highlighted in this study have semiochemical activities. We can consider that VOCs accumulated in bee abdomens are not the consequence of metabolism reorganization in response to a xenobiotic, but rather an accumulation of communication signals consecutive to the perturbation caused by fipronil. In this study, VOCs were recorded over a long experimental period (14 and 21 days). To record a volatolome deviation consecutive to a metabolism modulation, it may be necessary to perform the same analyses over short time periods, 24 or 48 h, for example. The choice of organism tissue is also of great importance: extracting VOCs from the head would have been a better way to link fipronil and counteracting VOCs.

Nonetheless, the characterization of VOCs recovered from a small number of bees offers an obvious way to monitor xenobiotic exposure in beehives regarding neuroreceptor associated molecules and pheromones. Clearly, we are unable to select the relevant biomarkers; more data are needed in both the laboratory and the open field. Our findings contribute to the proof of concept of volatolomics and help to understand the metabolic changes associated with pesticide poisoning in honeybees.

Author information

Corresponding author

Philippe Bouchard

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, 63170 Aubière, France

Email: philippe.bouchard@uca.fr

Erwan Engel

INRAE, UR370 Qualité des Produits Animaux, MASS group, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Email: erwan.engel@inrae.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Funding

This research was funded by L'Agence Nationale de la Recherche (BEELOSS ANR), Contrat de Plan Etat-Région (SYMBIOSE CPER), and the AURA region.

References

1. Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS, Afshari CA: **An overview of toxicogenomics**. *Curr Issues Mol Biol* 2002, **4**:45–56.
2. Hayward SAL: **Application of functional “Omics” in environmental stress physiology: Insights, limitations, and future challenges**. *Curr Opin Insect Sci* 2014, **4**:35–41.
3. Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH: **A multibiomarker approach to environmental assessment**. *Environ Sci Technol* 2004, **38**:1723–1731.
4. Ankley GT, Daston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, Miracle AL, Perkins EJ, Snape J, Tillitt DE, *et al.*: **Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology**. *Environ Sci Technol* 2006, **40**:4055–4065.
5. Poynton HC, Varshavsky JR, Chang B, Caviglioglio G, Chan S, Holman PS, Loguinov A V., Bauer DJ, Komachi K, Theil EC, *et al.*: **Daphnia magna ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity**. *Environ Sci Technol* 2007, **41**:1044–1050.
6. Bijlsma R, Loeschke V: **Environmental stress, adaptation and evolution: An overview**. *J Evol Biol* 2005, **18**:744–749.
7. Hidalgo K, Ratel J, Mercier F, Gauriat B, Bouchard P, Engel E: **Volatolomics in bacterial ecotoxicology, a novel method for detecting signatures of pesticide exposure?** *Front Microbiol* 2019, **10**:1–11.
8. Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A, Haick H: **Hybrid volatolomics and disease detection**. *Angew Chemie - Int Ed* 2015, **54**:11036–11048.
9. Giannoukos S, Agapiou A, Brkić B, Taylor S: **Volatolomics: A broad area of experimentation**. *J Chromatogr B* 2019, **1105**:136–147.
10. Ratel J, Mercier F, Angénieux M, Kondjoyan N, Abouelkaram S, Blinet P, Travel A, Royer E, Baéza-Campone E, Cariou R, *et al.*: **Identification by volatolomics of**

- hydrocarbon, oxygenated, sulfur and aromatic markers of livestock exposure to α -hexabromocyclododecane.** *Food Chem* 2022, **374**:1–8.
11. Berge P, Ratel J, Fournier A, Jondreville C, Feidt C, Roudaut B, Le Bizec B, Engel E: **Use of volatile compound metabolic signatures in poultry liver to back-trace dietary exposure to rapidly metabolized xenobiotics.** *Environ Sci Technol* 2011, **45**:6584–6591.
 12. Ratel J, Planche C, Mercier F, Blinet P, Kondjoyan N, Marchand P, Fournier A, Travel A, Jondreville C, Engel E: **Liver volatolomics to reveal poultry exposure to g-hexabromocyclododecane (HBCD).** *Chemosphere* 2017, **189**:634–642.
 13. Bouhleb J, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Abouelkaram S, Baéza E, Jondreville C, Travel A, Ratel J, Engel E, Rutledge DN: **Comparison of common components analysis with principal components analysis and independent components analysis: Application to SPME-GC-MS volatolomic signatures.** *Talanta* 2018, **178**:854–863.
 14. Defois C, Ratel J, Denis S, Batut B, Beugnot R, Peyretailade E, Engel E, Peyret P: **Environmental pollutant Benzo[a]Pyrene impacts the volatile metabolome and transcriptome of the human gut microbiota.** *Front Microbiol* 2017, **8**:1–12.
 15. Defois C, Ratel J, Garrat G, Denis S, Le Goff O, Talvas J, Mosoni P, Engel E, Peyret P: **Food chemicals disrupt human gut microbiota activity and impact intestinal homeostasis as revealed by *in vitro* systems.** *Sci Rep* 2018, **8**:1–12.
 16. Saeed A, Larik FA, Channar PA: **Recent synthetic approaches to fipronil, a super-effective and safe pesticide.** *Res Chem Intermed* 2016, **42**:6805–6813.
 17. Afssa, Afsse: **Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil - Synthèse et conclusion du rapport du groupe de travail : L' exposition au fipronil pourrait-elle entraîner un risque pour l' Homme ?** 2005,
 18. Bonnard N., D. Jagot, M. Falcy, K. Angeli, A. Fastier M-OR: **Fiche toxicologique n° 286 : Fipronil.** 2012,
 19. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Mcfield M, *et al.*: **Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates.** *Environ Sci Pollut Res* 2015, **22**:68–102.
 20. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P: **A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife.** *Environ Sci Pollut Res* 2015, **22**:103–118.
 21. VanEngelsdorp D, Meixner MD: **A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them.**

- J Invertebr Pathol* 2010, **103**:S80–S95.
22. Johnson RM: **Honey bee toxicology**. *Annu Rev Entomol* 2015, **60**:415–434.
 23. Es-Salah Z: **Analyse électrophysiologique, pharmacologique et moléculaire de facteurs modulant les effets d'un insecticide, le fipronil, sur des récepteurs gabaergiques d'insectes**. 2008,
 24. Casida JE, Durkin KA: **Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects**. *Annu Rev Entomol* 2013, **58**:99–117.
 25. Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Cousin M, Sénéchal J, Benet P, Kretzschmar A, Belzunces LP, *et al.*: **Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential**. *Sci Rep* 2016, **6**:1–12.
 26. Kairo G, Biron DG, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Tchamitchian S, Cousin M, Dussaubat C, Benoit B, Kretzschmar A, Belzunces LP, *et al.*: **Nosema ceranae, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology**. *Sci Rep* 2017, **7**:1–14.
 27. Zaluski R, Kadri SM, Alonso DP, Martins Ribolla PE, de Oliveira Orsi R: **Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses**. *Environ Toxicol Chem* 2015, **34**:1062–1069.
 28. Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP: **A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides**. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004, **47**:387–395.
 29. Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N: **Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides**. *PLoS One* 2014, **9**:1–12.
 30. Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N: **The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae***. *Microbes Environ* 2019, **34**:226–233.
 31. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui H, *et al.*: **Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae***. *PLoS One* 2011, **6**.
 32. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B,

- Belzunces LP, Delbac F, Blot N: **Parasite-insecticide interactions: A case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee.** *Sci Rep* 2012, **2**:1–7.
33. Paris L, Roussel M, Pereira B, Delbac F, Diogon M: **Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil.** *Microb Biotechnol* 2017, **10**:1702–1717.
34. Chowdhury L, Croft CJ, Goel S, Zaman N, Tai ACS, Walch EM, Smith K, Page A, Shea KM, Hall CD, *et al.*: **Differential potency of 2,6-dimethylcyclohexanol isomers for positive modulation of GABAA receptor currents.** *J Pharmacol Exp Ther* 2016, **357**:570–579.
35. Nakagawa T: **Insect repellent, US Patent US 20180064109A1.** 2018,
36. Hefetz A, Batra SWT: **Geranyl acetate and 2-decen-1-ol in the cephalic secretion of the solitary wasp *Sceliphron caementarium* (Sphecidae; Hymenoptera).** *Experientia* 1979, **35**:1138–1139.
37. Collins AM, Blum MS: **Alarm responses caused by newly identified compounds derived from the honeybee sting.** *J Chem Ecol* 1983, **9**:57–65.
38. Rochat D, Ramirez-Lucas P, Malosse C, Aldana R, Kakul T, Morin JP: **Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae).** *J Chromatogr A* 2000, **885**:433–444.
39. Schorkopf DLP, Hrnčir M, Mateus S, Zucchi R, Schmidt VM, Barth FG: **Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: Further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling.** *J Exp Biol* 2009, **212**:1153–1162.
40. Blum MS, Brand JM: **Social insect pheromones: Their chemistry and function.** *Integr Comp Biol* 1972, **12**:553–576.
41. Crewe RM, Blum MS: **Alarm pheromones in the genus *Myrmica* (Hymenoptera: Formicidae) - Their composition, and species specificity.** *Z Vgl Physiol* 1970, **70**:363–373.
42. Tengö J, Bergströ G, Borg-Karlson B, Groth I, Francke W: **Volatile compounds from cephalic secretions of females in two cleptoparasite bee genera, *Epeolus* (Hym., anthophoridae) and *Coelioxys* (Hym., megachilidae).** *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci* 1982, **37**:376–380.
43. Pickett JA, Williams IH, Martin AP, Smith MC: **Nasonov pheromon of the honey bee,**

- Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part I. Chemical characterization. *J Chem Ecol* 1980, **6**:425–434.
44. Pickett JA, Williams IH, Smith MC, Martin AP: **Nasonov pheromon of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part III. Regulation of pheromone composition and production.** *J Chem Ecol* 1981, **7**:543–554.
45. Williams IH, Pickett JA, Martin AP: **Nasonov pheromon of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part II. Bioassay of the components using foragers.** *J Chem Ecol* 1981, **7**:225–237.
46. Wolken WAM, Ten Have R, Van Der Werf MJ: **Amino acid-catalyzed conversion of citral: cis-trans Isomerization and its conversion into 6-methyl-5-hepten-2-one and acetaldehyde.** *J Agric Food Chem* 2000, **48**:5401–5405.
47. Sowden RJ, Yasmin S, Rees NH, Bell SG, Wong LL: **Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3.** *Org Biomol Chem* 2005, **3**:57–64.
48. Ganjewala D, Luthra R: **Essential oil biosynthesis and regulation in the genus *Cymbopogon*.** *Nat Prod Commun* 2010, **5**:163–172.
49. Lüddecke F, Wülfing A, Timke M, Germer F, Weber J, Dikfidan A, Rahnfeld T, Linder D, Meyerdierks A, Harder J: **Geraniol and geranial dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*.** *Appl Environ Microbiol* 2012, **78**:2128–2136.

III. Résultats marquants, discussion et conclusions :

Deux paramètres toxicologiques génériques ont été suivis pendant les 21 jours d'exposition chronique : la survie et la consommation de solution nutritive. Le suivi a montré que le fipronil (aux concentrations utilisées) a un effet chronique sur la survie mais n'entraîne aucune modification majeure du comportement alimentaire de l'organisme.

Au total, 281 pics ont été extraits dans cette étude. L'approche statistique par MANOVA a montré que les traitements ont un effet sur le volatolome total (effet concentration, effet temps d'exposition et effet interactionnel). 14 composés discriminants ont été isolés (ANOVA à un facteur et procédure de Newman et Keuls) et seuls 11 ont pu être identifiés. Aucune déviation (ACP) du volatolome n'a pu être observé après 14 jours d'exposition chronique au fipronil. Une déviation (*a priori* dose dépendante) est cependant présente (ACP) après 21 jours d'exposition au fipronil.

Dans ce travail, 10 des 11 COV discriminants identifiés peuvent être classés parmi les composés sémiocchimiques avec notamment des phéromones d'alarme, des agents répulsifs ou des composés liés à la glande de Nasonov, qui peuvent permettre la communication intra- et/ou interspécifique et donc modifier le comportement des organismes voisins (Crewe and Blum, 1970; Blum and Brand, 1972; Hefetz and Batra, 1979; Pickett *et al.*, 1980, 1981; Williams *et al.*, 1981; Tengö *et al.*, 1982; Collins and Blum, 1983; Rochat *et al.*, 2000; Schorkopf *et al.*, 2009; Nakagawa, 2018).

Habituellement, la volatolomique est considérée comme l'étude des composés de bout de chaîne métabolique (résidus du métabolisme primaire ou composés issus du métabolisme secondaire). Dans cette étude, plusieurs molécules ayant une activité sémiocchimique (acide nérolique, acide géranique et farnésol) ont été identifiées ainsi que des intermédiaires de leurs anabolisme ou catabolisme (géranyle acétone et 6-méthyl-5-heptène-2-one), ce qui nous a permis de reconstruire une partie de la voie métabolique qui a lieu dans la glande de Nasonov lors de l'exposition chronique à de faibles doses de fipronil (Pickett *et al.*, 1980, 1981; Williams *et al.*, 1981; Wolken *et al.*, 2000).

Parmi les COV identifiés, le 2,6- diméthylcyclohexanol est décrit dans la littérature comme un modulateur des GABA-R (Chowdhury *et al.*, 2016). Ce composé se lie aux GABA-R sur un site de liaison différent de celui du GABA et, par un effet allostérique, provoque une ouverture prolongée des canaux chlorure. Nous pouvons supposer que ce COV agit comme un modulateur produit par l'organisme pour compenser ou contrebalancer les effets induits par le fipronil. Dans cette étude, nous avons travaillé sur les COV provenant de la cuticule et du corps

gras. Or, le 2,6-diméthylcyclohexanol étant un composé ayant une activité neurotropicque, il ne peut provenir de ces tissus. Il a donc probablement été produit et/ou stocké dans les ganglions nerveux abdominaux restés attachés à la face interne de la cuticule après que le tractus digestif ait été retiré pour limiter la présence de COV issus du microbiote intestinal.

L'exposition chronique des abeilles à de faibles doses (de laboratoire) de fipronil génère une signature volatile comprenant 14 COV, dont la majorité possède une activité sémiochimique. Ainsi, ces COV accumulés dans les abdomens d'abeilles ne sont peut-être pas la conséquence d'une réorganisation du métabolisme en réponse à un xénobiotique, mais plutôt une accumulation de signaux de communication consécutive à la perturbation causée par le fipronil. La mise en évidence de cette déviation chez l'abeille a permis de compléter la preuve de concept initiée sur modèle bactérien.

*Chapitre n°3 Effet bénéfique
potentiel de deux COV,
modulateurs des GABA-R,
chez Apis mellifera
chroniquement exposée au
fipronil*

I. Introduction :

Titre :

Potentiel effet bénéfique de deux modulateurs des récepteurs GABA, le 2,6-diméthylcyclohexanol et le 1-octen-3-ol, chez l'abeille *Apis mellifera* chroniquement exposée à de faibles doses de fipronil.

Résumé français :

Le fipronil, un insecticide antagoniste non-compétitif des récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABA-R), inhibe le flux d'ions chlorures dans les cellules nerveuses ce qui conduit à la mort des abeilles. Dans une étude précédente, le volatolome de l'abeille exposée à cet insecticide (0.5 et 1 $\mu\text{g/L}$) a été analysé pour caractériser la réponse métabolique d'*Apis mellifera*. Deux Composés Organiques Volatils ou COV (1-octen-3-ol et 2,6-diméthylcyclohexanol) produits par l'abeille sont supposés agir comme des modulateurs des GABA-R permettant de contrebalancer les effets du fipronil. La toxicité de ces deux composés a été évaluée sur des abeilles émergentes pour des concentrations comprises entre 0 et 3.4 $\mu\text{g/L}$. La survie et la consommation de solution nutritive ont été suivies pendant 21 jours d'exposition chronique. Le 1-octen-3-ol et le 2,6-diméthylcyclohexanol n'ont pas montré d'effets toxiques majeurs chez *A. mellifera*. Le 1-octen-3-ol (à 0,5; 1; 1,7 et 3,4 $\mu\text{g/L}$) a été choisi pour évaluer son potentiel effet bénéfique dans le cas d'une co-exposition avec le fipronil (0,5 et 1 $\mu\text{g/L}$). Un effet bénéfique sur la survie a été observé à 21 jours, avec une amélioration du taux de survie comprise entre 21,3 \pm 9,4% et 25,7 \pm 2,9% pour les groupes co-exposés, quelle que soit la concentration en COV. L'effet pourrait être dû à un effet direct (interaction avec les GABA-R) ou à un effet hormétique (amélioration globale de la *fitness* de l'abeille). Le suivi de l'expression de gènes clés (dans les têtes d'abeilles) impliqués dans la gestion du stress oxydant, le métabolisme des xénobiotiques ou le métabolisme du GABA n'a révélé aucune variation notable. Les gènes ciblés ne peuvent donc pas être considérés comme des descripteurs associés aux effets du fipronil ou de la co-exposition avec le 1-octen-3-ol.

Contexte de l'étude :

Les pratiques agricoles actuelles visent à garantir la qualité et la sécurité alimentaire pour une population humaine toujours grandissante. Ces pratiques sont intrinsèquement liées à l'utilisation des intrants chimiques pour garantir des rendements de production importants tout en préservant les cultures d'organismes jugés nuisibles (Aktar *et al.*, 2009; Sánchez-Bayo, 2011b). Les pesticides utilisés actuellement sont dits généralistes et sont caractérisés par un spectre toxique large agissant aussi sur des organismes non-cibles (Aktar *et al.*, 2009; Casida, 2009). Les écosystèmes en périphérie des terres agricoles sont les premiers touchés par la dérive de ces produits phytosanitaires (Sánchez-Bayo, 2011b; Schafer *et al.*, 2011). Les effets observés sur les organismes non-cibles sont variés et dépendent notamment du pesticide, de l'organisme, de la dose, de la durée et de la voie d'exposition. Malgré l'utilisation d'un véritable arsenal chimique, les pertes agricoles annuelles sont estimées à 37% (plus d'un tiers de ces pertes sont dues aux insectes ravageurs de cultures) (Pimentel, 2009; Sánchez-Bayo, 2011b; Pimentel and Burgess, 2014a; Casida and Bryant, 2017). Les effets délétères sur l'environnement et l'apparition de résistance ont conduit les chercheurs et les industriels sur la piste de solutions à court et long terme comme le développement de nouveaux pesticides et de biopesticides, le développement des procédures de biocontrôle ou encore la recherche de molécules limitant l'impact des pesticides sur les organismes non-cibles.

L'abeille mellifère, *Apis mellifera*, est un auxiliaire des écosystèmes participant, *via* la pollinisation, à la production de plus de 30% des aliments consommés par l'Homme (VanEngelsdorp and Meixner, 2010). C'est donc un organisme fréquemment exposé aux pesticides (par contact direct lors de l'épandage, par l'alimentation, lors de l'activité de butinage, ...) (Johnson, 2015). Un déclin des populations d'abeilles domestiques a été observé en Amérique du Nord et en Europe il y a plus d'une trentaine d'année. Ce déclin peut être expliqué par des facteurs biotiques et abiotiques (et leurs interactions) dont les pesticides font partie intégrante (Potts *et al.*, 2010; VanEngelsdorp and Meixner, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Douglas *et al.*, 2020).

Le fipronil ou 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluorométhyl)-phényl]-4-trifluorométhylsulfinyl-1H-pyrazole-3-carbonitrile est un insecticide neurotoxique de la famille des phénylpyrazoles (Saeed *et al.*, 2016). Il présente un spectre toxique large contre les insectes nuisibles (fourmis, puces, tiques, sauterelles, ...) mais également contre des vertébrés (petits mammifères, oiseaux, poissons, amphibiens) et des invertébrés d'importance agronomique (abeilles, bourdons, papillons, ...) (Gibbons *et al.*, 2015; Pisa *et al.*, 2015). Les récepteurs GABA (GABA-R) sont des récepteurs membranaires formant un canal permettant le passage

d'un flux d'ions chlorures de la fente synaptique vers l'espace intracellulaire des cellules nerveuses. Ce flux d'ions chlorures a un rôle inhibiteur sur la propagation de l'influx nerveux. La fixation du fipronil (antagoniste non-compétitif) sur les GABA-R bloque le passage du flux d'ions chlorure et entraîne une hyperexcitabilité du système nerveux se traduisant à terme par la mort de l'organisme (Casida and Durkin, 2013; Johnson, 2015). Le fipronil est donc un insecticide systémique très toxique pour l'abeille avec une LD₅₀ de 4,2 ng/abeille (par voie orale sur 48h) (Pisa *et al.*, 2015).

Une étude volatolomique réalisée par Fernandes et collaborateurs (Fernandes *et al.*, 2023) a montré la présence d'une déviation du volatolome (fraction volatile du métabolome) chez *A. mellifera* chroniquement exposée à de faibles doses de fipronil. Un COV identifié dans cette étude, le 2,6-diméthylcyclohexanol, est décrit comme un modulateur des GABA-R (Hall *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2016). Un second COV, le 1-octen-3-ol, également décrit comme agissant sur les GABA-R (Hossain *et al.*, 2003; Johnston, 2006; Köksal, 2015) a été identifié dans la volatolome de l'abeille (non conservé dans l'étude pour un défaut de normalité).

Hypothèses de travail :

Dans ce travail, il a été supposé que le 2,6-diméthylcyclohexanol et le 1-octen-3-ol peuvent être qualifiés d'agonistes des GABA-R (Hossain *et al.*, 2003; Johnston, 2006; Hall *et al.*, 2011; Köksal, 2015; Chowdhury *et al.*, 2016). Une première hypothèse nous a donc conduit à envisager que ces deux COV pourraient se lier aux GABA-R chez *A. mellifera* et entraîneraient une ouverture prolongée des canaux chlorure dans les cellules nerveuses. La liaison de ces COV sur les GABA-R permettrait de contrebalancer les effets induits par le fipronil et de rétablir l'activité inhibitrice de l'influx nerveux médiée par les ions chlorure. Une seconde hypothèse serait qu'une compétition pourrait exister entre les COV et le fipronil pour la liaison sur les GABA-R.

Objectifs de l'étude :

Quatre principaux objectifs ont été développés dans cette étude :

- 1- Evaluer la toxicité du 2,6-diméthylcyclohexanol et du 1-octen-3-ol chez *A. mellifera* dans le cas d'une exposition chronique par voie trophique (21 jours) en se basant sur deux descripteurs toxicologiques génériques : la survie et la consommation de solution nutritive;

- 2- Evaluer le potentiel effet bénéfique de faibles doses de 1-octen-3-ol dans le cas d'une co-exposition (chronique par voie trophique sur 21 jours) avec de faibles doses de fipronil en utilisant les mêmes descripteurs génériques;
- 3- Evaluer les effets à l'échelle moléculaire en se basant sur l'étude de l'expression de gènes clés (gestion du stress oxydant, métabolisme des xénobiotiques et métabolisme du GABA) dans la tête des abeilles au cours du temps (au début de l'expérience, après 2, 7 et 14 jours de co-exposition);
- 4- Valoriser des composés mis en évidence dans le cas d'une approche de toxicogénomique non-ciblée.

II. Article :

Fernandes, V. and Sbaghdi, T.; Suchet, M.; Blot, N.; Delbac, F. and Bouchard, P. Potential beneficial effect of two GABA-receptor modulators, 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol, in *A. mellifera* chronically exposed to low doses of fipronil. *In prep.*

Potential beneficial effect of two GABA-receptor modulators, 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol, in *A. mellifera* chronically exposed to low doses of fipronil

Vincent Fernandes¹ and Thania Sbaghdi¹, Marine Suchet, Nicolas Blot¹, Frédéric Delbac¹ and Philippe Bouchard^{1*}.

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Abstract

Fipronil, a non-competitive antagonist of γ -aminobutyric acid receptors (GABA-Rs), inhibits the flow of chloride ions in the nerve cells, leading to the insect death. In a previous work, the volatolome of bees chronically exposed to this insecticide (0.5 and 1 $\mu\text{g/L}$) was analyzed and characterize the *Apis mellifera* metabolic responses. Two Volatile Organic Compounds or VOCs (1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol) produced by bee were highlighted. We assumed that these VOCs could act as modulators of the GABA-R to counteract the effect of fipronil. The toxicity of these VOCs was tested on emerging bees for concentrations ranging from 0 to 3.4 $\mu\text{g/L}$. Survival and the sucrose consumption were recorded during 21 days of chronic exposure. 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol show no toxic effect in *A. mellifera*. 1-octen-3-ol (0.5, 1, 1.7 and 3.4 $\mu\text{g/L}$) was chosen to assess its effect in the case of co-exposure with fipronil (0.5 and 1 $\mu\text{g/L}$). A beneficial effect on survival at 21 days was observed with an average improvement in survival rate about $21.3 \pm 9.4\%$ to $25.7 \pm 2.9\%$ for the co-exposed groups. This positive effect was not related to the VOC concentration and could be a direct effect (interaction with GABA-R) or a hormetic effect (global improvement of bee fitness). Gene expression analysis, in the bees head, was also performed on key genes involved in oxidative stress management, xenobiotic metabolism and GABA metabolism. No treatment effect was observed. Selected genes can't be considered as descriptors of the effects associated with fipronil exposure or co-exposure with the VOC.

Key words: pesticide poisoning, ecosystem auxiliaries, honeybees, GABA receptors, volatile organic compounds

Introduction

Conventional agricultural practices are closely related to pesticides use (protecting crops from organisms designated as pests) to guarantee food safety and quality for a growing human population [1,2]. Despite the use of such a “chemical arsenal”, annual agricultural losses are estimated at 37%, more than a third due to insect pests [2,3]. A good pesticide is a substance that targets only the pests it is intended to control. Actually, this is not the case with the most used insecticides, which are generalist compounds with a broad toxic spectrum, affecting numerous non-target organisms [1,4]. Ecosystems surrounding agricultural lands are the first to be affected by the drift of these phytosanitary products [2,5].

The Western honeybee, *Apis mellifera*, is an ecosystem auxiliary that contributes to the production of more than 30% of the food consumed by human, through pollination [6]. Through its behavior, it is exposed to pesticides by direct contact during spraying, by foraging and consuming contaminated resources [7]. A decline in honeybee populations has been observed in North America and Europe over the three past decades, affecting their ecological importance and agronomic value. This decline is thought to be multicausal, involving biotic stressors, such as pathogens and parasites, and abiotic factors of which pesticides seems important determinants [6,8–10].

Neurotoxic insecticides, such as phenylpyrazoles and neonicotinoids, are the most applied insecticide. Phenylpyrazoles are characterized by a pyrazole ring associated with a phenyl group. Fipronil, or 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)-phenyl]-4-trifluoromethyl-sulfinyl-1H-pyrazole-3-carbonitrile, is the most common insecticides of this family [11]. It is an insecticide with a broad toxic spectrum against pests (ants, fleas, ticks, grasshoppers, ...). It also has a broad toxic spectrum against vertebrates (small mammals, birds, fishes, amphibians) and invertebrates of agronomic importance such as bees, bumblebees or butterflies [12,13]. It was developed by the French company Rhône-Poulenc in the late 1980s. Following its launch in 1993, fipronil was incorporated in various commercial formulations until his banishment for agricultural use in European Union in 2017, due to the deleterious effects observed on mammals (disruption of neural, endocrine, renal and hepatic functions). Also, fipronil is still used in veterinary medicine and domestic use [11,14–16].

Fipronil acts as a non-competitive antagonist of γ -aminobutyric acid receptors (GABA-Rs). GABA-Rs are membrane receptors forming a channel allowing the flow of chloride ions from the synaptic cleft to the intracellular space of nerve cells. This flow of ions inhibits the

propagation of nerve impulses. Binding of fipronil to GABA-Rs blocks the chloride ions flow resulting to the nervous system hyperexcitability, leading to the death of the exposed organism [7,17]. Fipronil is highly toxic for bees with an acute oral LD₅₀ of 4,2 ng/bee over 48h [13]. Chronic exposure to low doses induces many sublethal effects on energetic metabolism [18–20], reproduction [21,22], development [23], behavior [24–26] or even on the structure of the gut microbiota [27].

Volatile Organic Compounds (VOCs) analyses allow the study of the volatile fraction of the metabolome, known as volatolome, of an organism [28,29]. A volatolome deviation has been observed in *A. mellifera* workers chronically exposed to low doses of fipronil [30]. Among VOCs identified in this work one, 2,6-dimethylcyclohexanol, is described as a modulator of GABA-Rs in mammals [31,32]. Another VOC, 1-octen-3-ol, also described as acting on GABA-Rs in mammals [33–35] has been identified in the bee volatolome (but not included in the study [30] because of a normality defect). In mammals, binding of 2,6-dimethylcyclohexanol and 1-octen-3-ol to GABA-R leads to prolonged opening of these chloride channels. It has been supposed that both VOC may interfere with fipronil for GABA-R binding. VOC action could counterbalance the effects of fipronil by extending the opening time of chloride channels [32,33,35,36]. The aims of the present study was to (i) evaluate the toxicity of a chronic exposure to 2,6-dimethylcyclohexanol and 1-octen-3-ol on *A. mellifera* workers, (ii) evaluate a beneficial potential effect of 1-octen-3-ol in the case of co-exposure with low doses of fipronil and (iii) depict descriptors at the molecular level by studying the differential expression of selected genes (oxidative management, xenobiotics metabolism, GABA metabolism) in honeybees heads, where the cerebral ganglia are concentrated.

Materials and Methods

2.1. Toxicity assessment of 2,6-dimethylcyclohexanol and 1-octen-3-ol.

2.1.1. Sampling of honeybees.

Six brood frames were collected from six hives in the laboratory apiary (UMR 6023, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Frames were placed in the dark, at 35°C with a relative humidity of 60%, until adult workers emergence. Emergent honeybees were distributed in 60 pain-type cages with 50 bees/cage. Honeybees were fed with a 50% sucrose solution supplemented with 1% Provitabee® (Biové Laboratory). A small piece of

PseudoQueen[®] (Contech Enterprises, Inc.) was placed in each cage to mimic the hive environment. Honeybees were kept in the dark, at 33°C with 60% relative humidity.

2.1.2. VOCs exposure and toxicity assessment.

Two days after caging, fifteen experimental conditions were defined, with four cages per condition: one unexposed control group, seven groups chronically exposed to different concentrations (0.25; 0.5; 0.75; 1; 1.25; 1.7 and 3.4 µg/L of sucrose solution) of 2,6-dimethylcyclohexanol (Thermo Scientific Chemicals), and seven groups chronically exposed to the same concentrations of 1-octen-3-ol (Sigma-Aldrich). VOCs exposure range was designed to frame (0.25 to 1.25 µg/L) the mass concentrations of fipronil used by Fernandes *et al.* (2023) [30] and also to correspond to the molar equivalent (1.7 and 3.4 µg/L) of these same fipronil concentrations.

VOCs stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich). The sucrose solutions in exposed conditions were supplemented with the VOCs stock solutions to reach the desired concentrations and a final DMSO concentration of 0.1%. Unexposed control group was fed with a sucrose solution containing 0.1% DMSO. Exposures were performed chronically by trophic route. Honeybees were fed *ad libitum* for 21 days and the sucrose solutions were changed daily. The honeybees were placed in separated incubators to avoid contamination with VOCs.

Mortality and sucrose consumption were monitored daily, by counting dead bees and weighing feeders respectively.

2.1.3. Data treatment.

Data were analysed using R software (version 4.3.0., <http://www.R-project.org>). First, a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test were carried out to test normality and homoscedasticity of the data. Survival data were transformed into Kaplan-Meier distributions in which Cox-Mantel test was performed. For survival rates obtained at 21 days and consumption data, a Kruskal-Wallis test and a Dunn test (with Bonferroni adjustment for consumption data) were carried out.

2.2. Effect of 1-octen-3-ol/fipronil co-exposure on *A. mellifera*.

2.2.1. Sampling of honeybees.

Seven frames were collected from seven colonies of the same apiary. Emergent bees were distributed in 60 pain-type cages with 70 bees/cage. Rearing conditions were similar to those described earlier.

2.2.2. Exposure to 1-octen-3-ol and/or fipronil.

Four 1-octen-3-ol concentrations (0.5; 1; 1.7 and 3.4 µg/L of feeding solution) were selected following the first experiment. Two concentrations of fipronil (0.5 and 1 µg/L of feeding solution) were used. These two fipronil concentration were used in the study conducted by Fernandes *et al.*, (2023) [30] and are traditionally used in the laboratory to induce chronic effects. Two days after caging, fifteen experimental conditions were defined: one unexposed control group, four groups exposed to the different 1-octen-3-ol concentrations (abbreviated O1 to O4), two groups exposed to both fipronil concentrations (abbreviated Fip0.5 and Fip1) and eight groups co-exposed with fipronil and 1-octen-3-ol (abbreviated Fip0.5-O1 to Fip0.5-O4 and Fip1-O1 to Fip1-O4).

A fipronil stock solution (100 g/L) (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich) was made in DMSO. 1-octen-3-ol stock solutions were prepared as described in section 2.1.2. *VOCs exposure and toxicity assessment*. Sucrose solutions were supplemented with 1-octen-3-ol and/or fipronil stock solutions to achieve the desired concentrations. The feeding solution of the unexposed control group was supplemented with 0.1% DMSO. The exposures and co-exposures were performed chronically (by trophic route) for 21 days.

Mortality and consumption descriptors were monitored as described earlier. Consumption data were not recorded if the number of alive bees in a given cage was lower than ten.

2.2.3. Data treatment.

Mortality and sucrose consumption data were analysed as described in the section 2.1.3. *Data treatment*. In addition, 1-octen-3-ol and fipronil consumption analysis were performed using a Mann-Whitney test (with Bonferroni adjustment). For the cumulative xenobiotic consumption, when the number of alive bees in a given cage was lower than 10, the xenobiotic consumption values were replaced by the mean of the daily xenobiotic consumption of the same cage. The analysis of these data was carried out using a Mann-Whitney test (with Bonferroni adjustment).

2.3. Expression quantification of selected molecular descriptors.

2.3.1. Sampling of honeybees head.

Three honeybees were collected from each cage (12 bees/conditions) at the beginning of the experiment (D0) and after two, seven and fourteen days (D2, D7 and D14) to evaluate changes in gene expression. The heads were dissected *post-mortem* and placed in bead tubes

(Bead Tubes Type C, Macherey-Nagel) with 1 mL TRIzol™ (Invitrogen), then immersed in liquid nitrogen to prevent RNA degradation. Samples were stored at -80°C until the extraction step. The head was chosen for this experiment because it contains the cerebral ganglia and it's assumed in this work that the density of GABA-R is highest.

2.3.2. RNA extraction and cDNA synthesis.

Heads were ground using FastPrep®-24 (6.0 m/S, 2x45 sec) (MP Biomedicals). Following phenol/chloroform extraction, total RNAs were purified using the RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), following the supplier's instructions. A 30 min DNase treatment (RNase-Free DNase Set, QIAGEN) at room temperature was performed to reduce genomic DNA contamination. RNA quantification and quality were evaluated using TapeStation-4150 (Agilent Technologies) and the RNA Screen Tape Kit (Agilent Technologies). RNAs extracts were stored at -80°C until the reverse transcription step.

Reverse transcription was carried out on 800 ng RNA using the SuperScript™ III Kit (Invitrogen) according to supplier's instructions and the ProFlex PCR System (Applied Biosystems). The cDNAs were stored at -20°C until qPCR step.

Table 1. Characteristics of primers pairs used for the quantitative PCR. Linearity, efficiency, DNA dilution range and C_Q range were determined using total DNA extract from three *A. mellifera* head.

Target gene	Primers pairs (5' → 3')	T _m (in °C)	Amplicon size (bp)	Linearity (r ²) Efficiency (E)	Validated DNA dilution (d) and C _Q ranges	Reference
<i>Rps18</i>	F-GATTCCCGATTGGTTTTTGAATAG R-AACCCCAATAATGACGCAAACC	58.2	152	r ² = 0.989 E = 0.89	d: 4 to 256 C _Q : 20 to 25	[37]
<i>Sod2</i>	F-TAAACCAGACGCTGCACTTC R-CCCAACCAGAACCTTGAATCG	58.8	110	r ² = 0.999 E = 0.90	d: 4 to 1024 C _Q : 23 to 33	This work
<i>Cat2</i>	F-AAGCCAGTTTGACGGTAGGG R-AGCATGGACTACACGTTCCG	60.0	113	r ² = 0.997 E = 0.88	d: 4 to 1024 C _Q : 20 to 26	[38]
<i>Gsts1</i>	F-ATTCCTGGTCTTGCCGAACC R-TGGGCCATTCTTCGATATCAATTC	59.8	91	r ² = 0.999 E = 0.80	d: 4 to 64 C _Q : 25 to 28	[38]
<i>Gaba-At</i>	F-ATCAACTACCTGGCACACCG R-AGGCCAATCAAAAGCTGGGA	60.0	134	r ² = 0.997 E = 0.81	d: 4 to 64 C _Q : 20 to 25	This work
<i>Glu-D</i>	F-CGAGCCAAGGGTACAGAAGG R-AGTGTGCGGCATGTTCTTAA	60.0	177	r ² = 0.998 E = 0.84	d: 4 to 256 C _Q : 26 to 33	This work

2.3.3. Gene expression analysis by quantitative PCR.

The expression of Catalase 2 (*Cat2*), Superoxide dismutase 2 (*Sod2*), Glutathione-S-transferase S1 (*Gsts1*), GABA aminotransferase (*Gaba-At*) and Glutamate decarboxylase (*Glu-D*), was measured by quantitative PCR (qPCR) using the primers listed in **Table 1**. The expression of *Rps18*, encoding the ribosomal protein s18, was used to normalize the data. The qPCR reactions were performed in triplicates using the CFX96™ Real Time System (BIO-RAD), in a final volume of 25 µL that comprised 12.5 µL of 2X Absolute Blue SYBR Green buffer (Thermo Fischer Scientific), 1.75 µL of a primer solution containing reverse and forward primers (1 µM), 2.5 µL of template cDNA and 8.25 µL of molecular grade water (Mediatech, Inc.). Following an initial denaturation for 5 min at 94°C, 40 cycles were performed with 15 sec at 94°C for denaturation, 25 sec at 55°C for primer annealing and 30 sec at 72°C for polymerase elongation.

2.3.4. Data treatment.

First, the qPCR data were analysed according to the scheme propose by the Genomics Platform (Institute of research in immunology and cancer, University of Montreal, https://genomique.irc.ca/Infos_qPCR).

A Shapiro-Wilk test and a Bartlett test were carried out to test normality and homoscedasticity of the data. In the control condition, the evolution of key genes expression (over the time) was analysed using a one-way ANOVA and Tukey *post-hoc* procedure (with Bonferroni adjustment). To study the joint effect of time and treatment for a given gene, a Scheirer-Ray-Hare test was performed, a Dunn *post-hoc* procedure (with Bonferroni adjustment) was carried out on significant factors and a Mann-Whitney test (with Bonferroni adjustment) on non-significant factors.

Results

3.1. Toxicity assessment of 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol in *A. mellifera*.

3.1.1. Effect of VOCs exposure on survival.

Kaplan-Meier distributions analyses showed a significantly decrease of survival in groups exposed to 1.25 and 3.4 µg/L of 1-octen-3-ol (Cox-Mantel test, *p-value* = 0.0225 and 0.005 respectively) or to 0.25, 0.75 and 3.4 µg/L of 2,6-dimethylcyclohexanol (*p-value* = 0.024, 0.003 and < 0.001 respectively) compared to the untreated honeybees (**Figure S1**). However, the honeybee survival at the end of the experiment was not significantly different (*P-value* >

0.05, Dunn test) whatever the tested condition (**Figure 1**), with an average survival rate of $74.71 \pm 16.84\%$ to $86.37 \pm 4.48\%$ for honeybees exposed to 1-octen-3-ol, $66.55 \pm 7.35\%$ to $89.89 \pm 1.95\%$ for honeybees exposed to 2,6-dimethylcyclohexanol, compared to $85.77 \pm 3.4\%$ for untreated honeybees. 1-octen-3-ol and 2,6-dimethylcyclohexanol had no toxic effect (at the tested concentrations) inducing an excess mortality in *A. mellifera*. These results are in accordance with the toxicological analysis performed prior this experiment (unpublished data). In addition, no dose-response effect was found on the survival of bees chronically exposed to both VOCs.

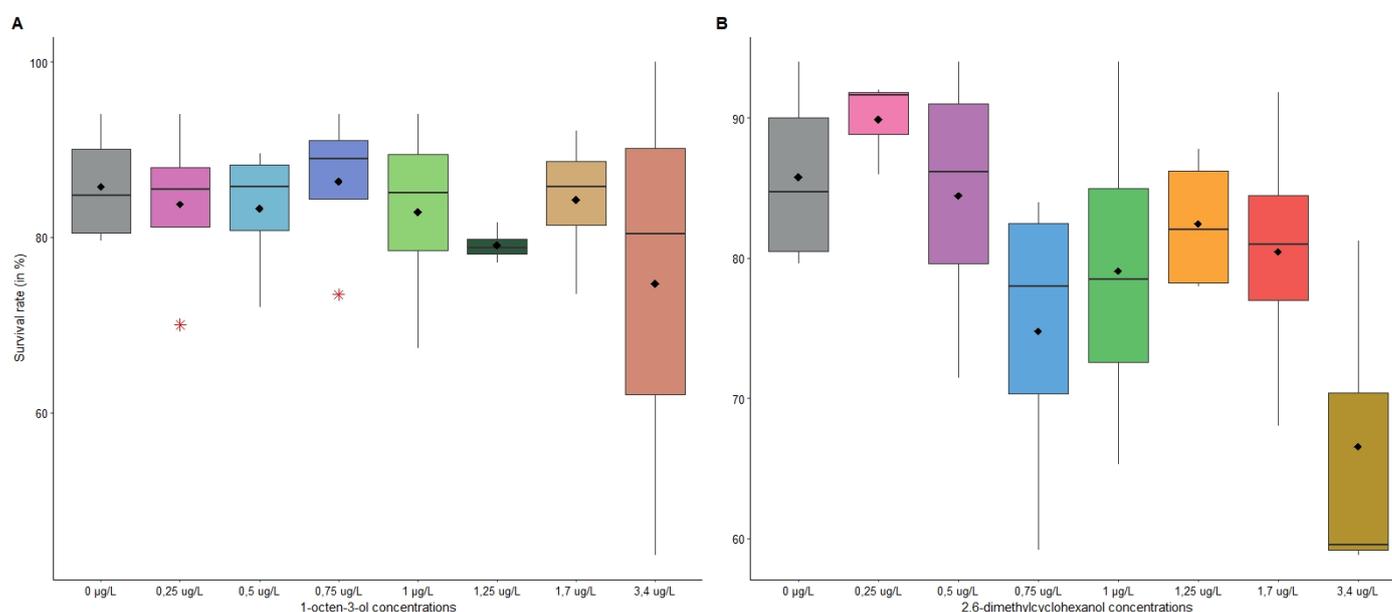


Figure 1. Average survival rate of honeybees after 21 days of chronic exposure to 1-octen-3-ol (**A**) or 2,6-dimethylcyclohexanol (**B**). Honeybees were exposed to the indicated concentrations of VOCs through sucrose feeding *ad libitum*. The average survival rate was calculated at 21 days on 4 replicates of 50 bees for each experimental condition (or 3 replicates for groups exposed to 3.4 µg/L). Black diamonds and black horizontal bars represent the average and median survival rate after 21 days respectively. Red asterisks represent outlier values. No significant differences in average survival rate after 21 days of chronic exposure compared to the control group according to a Dunn test.

3.1.2. Effect of VOCs exposure on daily food consumption.

Over the experimental period, bees in control condition consumed an average of 35 ± 5 mg of nutritive solution per bee per day (**Figures 2**). For groups exposed to 1-octen-3-ol (**Figure 2A**), the average daily food intake was 32.7 ± 5.5 mg/bee/day, that of groups exposed to 2,6-dimethylcyclohexanol (**Figure 2B**) was 31.5 ± 5.6 mg/bee/day. Only the group exposed to 0.75 µg/L of 1-octen-3-ol showed a significant decrease in average daily consumption (p -value < 0.05, Dunn test with Bonferroni adjustment) compared to control condition. At the tested

concentrations, 1-octen-3-ol had no effect on *A. mellifera* daily food intake. In the case of 2,6-dimethylcyclohexanol, *a contrario*, only the group exposed to 0.75 $\mu\text{g/L}$ showed no difference ($p\text{-value} > 0.05$, Dunn test with Bonferroni adjustment) in average daily consumption with the control condition. For all other concentrations, we notice a decrease with a relative drop of $10.2 \pm 4\%$ (on average) compared to the control group. 2,6-dimethylcyclohexanol had a larger effect than 1-octen-3-ol on daily food intake. It is difficult to consider whether 2,6-dimethylcyclohexanol had a potential slight antifeeding activity or a repellent effect. Interestingly, the change in feeding behavior induced by this VOC does not lead to have any impact on the bees.

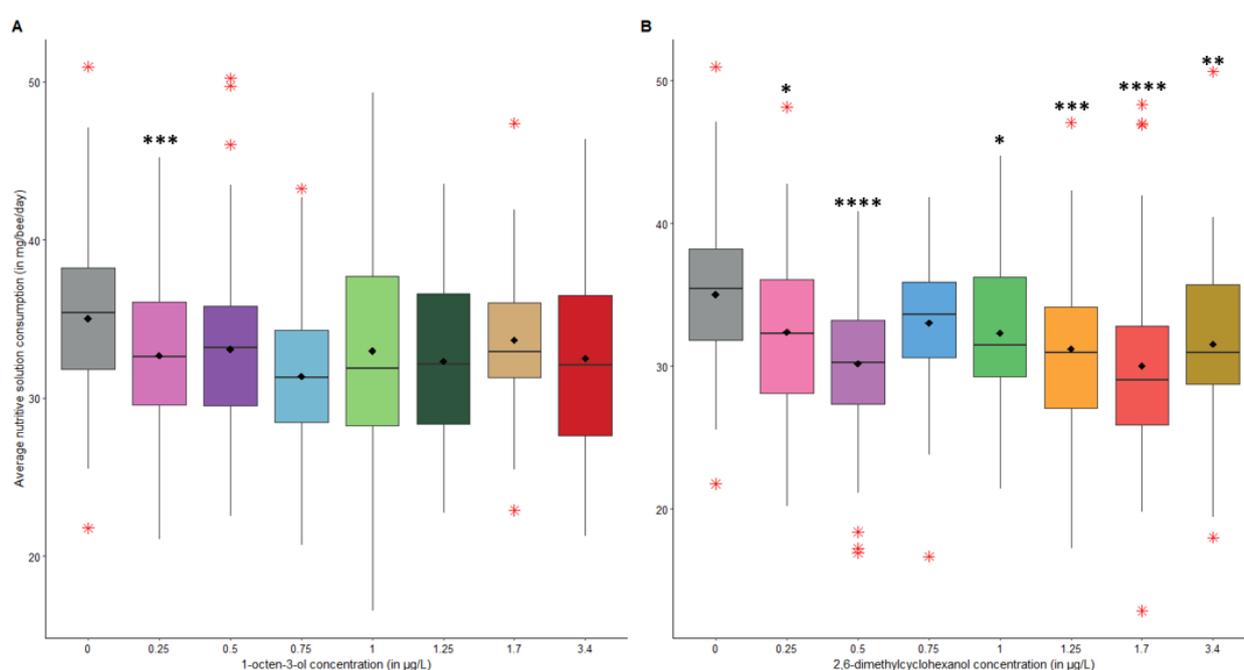


Figure 2. Sucrose consumption of honeybee chronically exposed to 1-octen-3-ol (A) or 2,6-dimethylcyclohexanol (B). Honeybees were exposed to the indicated concentrations of VOCs through sucrose feeding *ad libitum*. The sucrose consumption was estimated over 21 days on 4 replicates of 50 bees for each experimental condition (or 3 replicates for groups exposed to 3.4 $\mu\text{g/L}$). Black diamonds and black horizontal bars represent the average and median daily consumption respectively. Red asterisks represent outlier values. Significant differences in daily food intake compared to the control group are represented by black asterisks ($p\text{-value} < 0.05$, Dunn test with Bonferroni adjustment).

3.2. Effect assessment of a 1-octen-3-ol/fipronil co-exposure in *A. mellifera*.

3.2.1. Effect of the co-exposure on survival.

Since 1-octen-3-ol not affect the food intake and induced a lower observed mortality than 2,6-dimethylcyclohexanol, it was chosen to assess its combination with fipronil. As no dose-response effect was found, four 1-octen-3-ol concentrations (0.5, 1, 1.7 and 3.4 $\mu\text{g/L}$)

representing the mass and molar equivalents of fipronil concentrations used by Fernandes *et al.* (2023)[30] (0.5 and 1 $\mu\text{g/L}$) were selected for the following experiments.

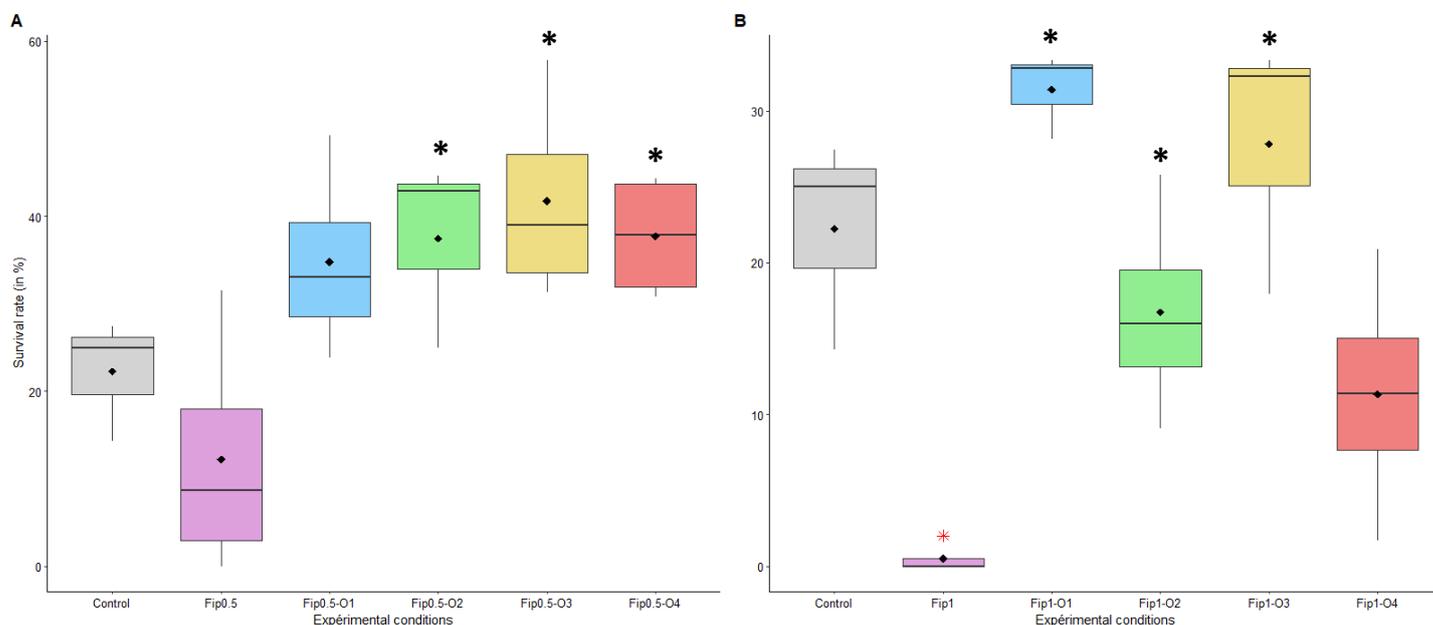


Figure 3. Average survival rate of honeybees after 21 days of chronic co-exposure to 1-octen-3-ol and fipronil at 0.5 $\mu\text{g/L}$ (A) or 1 $\mu\text{g/L}$ (B). Honeybees were exposed through sucrose feeding *ad libitum*. The average survival rate was calculated at 21 days on 4 replicates of 70 bees for each experimental condition. Black diamonds and black horizontal bars represent the average and median survival rate after 21 days respectively. Red asterisks represent outlier values. Significant differences in average survival rate after 21 days of chronic co-exposure, compared to the corresponding fipronil group, are represented by black asterisks ($p\text{-value} < 0.05$, Dunn test).

Kaplan-Meier distributions showed (Figures S2 and S3A) a sharp decrease ($77.8 \pm 7\%$) in the survival of the control condition at 21 days indicating an inherent sensitivity (health status) of the bees used. No survival difference was found between the Fip0.5 group and the control group (Cox-Mantel test, $p\text{-value} = 0.057$), while a difference was observed for Fip1 condition (Cox-Mantel test, $p\text{-value} < 0.0001$). For honeybees co-exposed to 1-octen-3-ol and fipronil at 0.5 $\mu\text{g/L}$ (Fip0.5-O1 to Fip0.5-O4) (Figure S2A), a difference (Cox-Mantel test) was observed for the four tested VOC concentrations compared to the fipronil exposed group. This increase in survival was also observed for honeybees co-exposed to 1-octen-3-ol and fipronil at 1 $\mu\text{g/L}$ (Fip1-O1 to Fip1-O4) (Figure S2B), a difference (Cox-Mantel test) was observed for the four co-exposed groups compared to the fipronil exposed group. Differences ($p\text{-value} < 0.05$, Cox-Mantel test) indicating a better survival of co-exposed bees was observed by comparison of Kaplan-Meier distributions of co-exposed groups and fipronil-exposed groups. These differences were also highlighted by comparison of the survival rate at 21 days ($p\text{-value} < 0.05$, Dunn test) (Figures 3).

An average increase in survival rate of $25.7\pm 2.9\%$ was observed for the groups co-exposed with $0.5\ \mu\text{g/L}$ of fipronil, and of $21.3\pm 9.4\%$ for the groups co-exposed with $1\ \mu\text{g/L}$ of fipronil. In conclusion, 1-octen-3-ol seems had a beneficial effect on the survival of *A. mellifera* chronically exposed to low doses of fipronil. However, no dose-response effect was observed, suggesting that the improvement in survival was not related to the 1-octen-3-ol concentration.

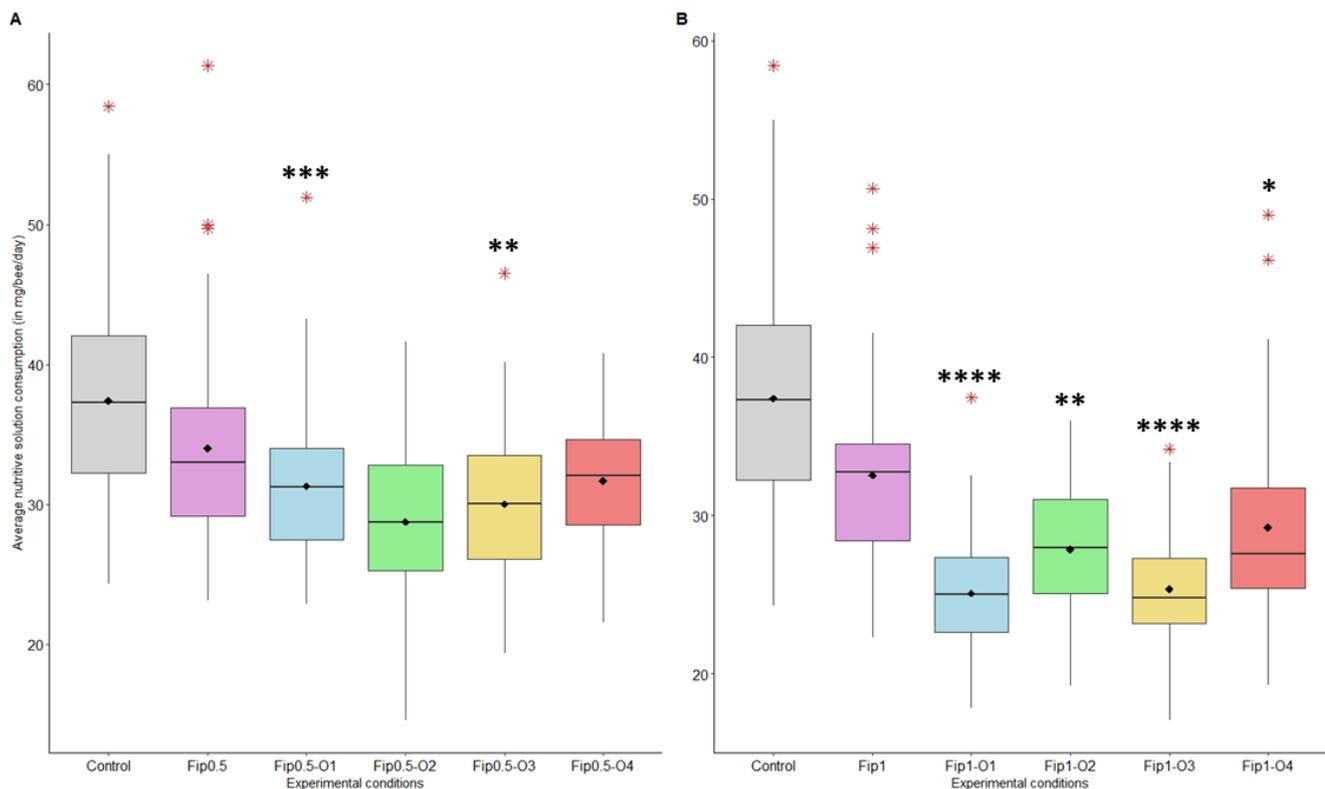


Figure 4. Sucrose consumption of honeybee chronically co-exposed to 1-octen-3-ol and fipronil at $0.5\ \mu\text{g/L}$ (A) or $1\ \mu\text{g/L}$ (B). Honeybees were exposed to the indicated concentrations of VOCs through sucrose feeding *ad libitum*. The sucrose consumption was estimated over 21 days on 4 replicates of 70 bees for each experimental condition. Black diamonds and black horizontal bars represent the average and median daily consumption respectively. Red asterisks represent outlier values. Significant differences in daily food intake compared to the control group are represented by black asterisks ($p\text{-value} < 0.05$, Dunn test with Bonferroni adjustment).

3.2.2. Effect of the co-exposure on daily food, fipronil and 1-octen-3-ol intakes.

Over the experimental period, bees in control condition consumed an average of 37.4 ± 7 mg/bee/day (Figures 4 and S3B). For groups exposed to 1-octen-3-ol (Figure S3B), the average daily food intake was 33.5 ± 5.7 mg/bee/day. Daily average food consumption in Fip0.5 group was 34 ± 6.7 mg/bee/day (Figure 4A), while it was 32.5 ± 6.1 mg/bee/day in the Fip1 group (Figure 4B). No difference ($p\text{-value} > 0.05$, Dunn test with Bonferroni adjustment) was found between the control group and the fipronil-exposed groups. As mentioned in previous studies

[30,39], fipronil shows no antifeeding activity or a repellent effect (at the concentrations used) in honeybees. For groups Fip0.5-O1 to Fip0.5-O4 (**Figure 4A**) the average daily consumption was 30.6 ± 5.1 mg/bee/day, while that for the groups Fip1-O1 to Fip1-O4 (**Figure 4B**) was 27.1 ± 4.8 mg/bee/day. The co-exposed groups consumed significantly less (p -value < 0.05, Dunn test with Bonferroni adjustment) than groups exposed to fipronil alone (except for conditions Fip0.5-O1 and Fip0.5-O4). This decrease in daily food intake represents a relative average drop of $10.5 \pm 3.9\%$ for the groups co-exposed with 0.5 $\mu\text{g/L}$ of fipronil and of $16.7 \pm 6.2\%$ for the groups co-exposed with 1 $\mu\text{g/L}$ of fipronil. No dose-response effect was found, the decrease in daily consumption was not related to the 1-octen-3-ol concentration.

Table 2. Cumulative and average daily consumption of fipronil and 1-octen-3-ol by bees in the different experimental conditions. For daily and cumulative fipronil consumption the differences are represented by lowercase letters for the groups (co-)exposed to 0.5 $\mu\text{g/L}$ or capital letters for groups (co-)exposed to 1 $\mu\text{g/L}$. When two conditions are characterized by the same letter, there is no significant difference between them (p -value > 0.05 according to a Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment). For the daily VOC intake, if two conditions are characterized by the same symbol, there is no difference between them (p -value > 0.05 according to a Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment). No differences have been observed for the cumulative VOC consumption by comparison of groups exposed at the same concentration (p -value > 0.05 according to a Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment).

Experimental conditions	Daily fipronil intake (ng/bee/day)	Cumulative fipronil intake (ng/bee/21 days)	Daily VOC intake (ng/bee/day)	Cumulative VOC intake (ng/bee/21 days)
O1	/	/	$0.014 \pm 0.002^*$	0.2678 ± 0.026
O2	/	/	0.030 ± 0.004	0.554 ± 0.036
O3	/	/	0.052 ± 0.007	0.994 ± 0.056
O4	/	/	0.103 ± 0.020	1.957 ± 0.116
Fip0.5	0.015 ± 0.003^a	0.272 ± 0.025^a	/	/
Fip0.5-O1	$0.014 \pm 0.002^{a, b, c}$	0.263 ± 0.011^a	$0.014 \pm 0.002^*$	0.263 ± 0.010
Fip0.5-O2	0.013 ± 0.002^b	0.242 ± 0.022^a	$0.024 \pm 0.005^*$	0.460 ± 0.046
Fip0.5-O3	$0.013 \pm 0.002^{b, c}$	0.252 ± 0.018^a	0.045 ± 0.008	0.858 ± 0.060
Fip0.5-O4	$0.014 \pm 0.002^{a, c}$	0.266 ± 0.011^a	0.095 ± 0.012	1.812 ± 0.075
Fip1	0.029 ± 0.005^A	0.504 ± 0.098^A	/	/
Fip1-O1	0.022 ± 0.003^B	0.422 ± 0.022^A	0.011 ± 0.002	0.211 ± 0.011
Fip1-O2	0.025 ± 0.004^C	0.468 ± 0.020^A	$0.025 \pm 0.004^*$	0.468 ± 0.020
Fip1-O3	0.022 ± 0.003^B	0.426 ± 0.017^A	0.038 ± 0.006	0.724 ± 0.026
Fip1-O4	0.026 ± 0.005^C	0.494 ± 0.035^A	0.090 ± 0.020	1.562 ± 0.189

This slight disruption in feeding behavior led to changes in daily consumption of fipronil and 1-octen-3-ol, notably in the conditions with the highest exposure concentrations (**Table 2**). However, co-exposed bees show a better survival rate than Fip1 bees. In that case, exposure period is longer since bees exposed to fipronil alone should theoretically die earlier. In terms of cumulative fipronil consumption (**Table 2**), there is no difference between fipronil-exposed groups and co-exposed groups (p -value > 0.05, Mann-Whitney test with Bonferroni adjustment). The same results were observed for the 1-octen-3-ol (**Table 2**).

Separately, both compounds had no effect on consumption in *A. mellifera*, but a co-exposure altered the feeding behavior. This decrease was also observed in preliminary work (unpublished data) where bees were co-exposed to fipronil (0.5 µg/L) and 1-octen-3-ol or 2,6-dimethylcyclohexanol (0.5 µg/L). This reduction does not appear to be specific of 1-octen-3-ol/fipronil co-exposure. In short, the decrease in daily food intake is not a determining factor in improvement of survival rate of bees after 21 days of chronic exposure.

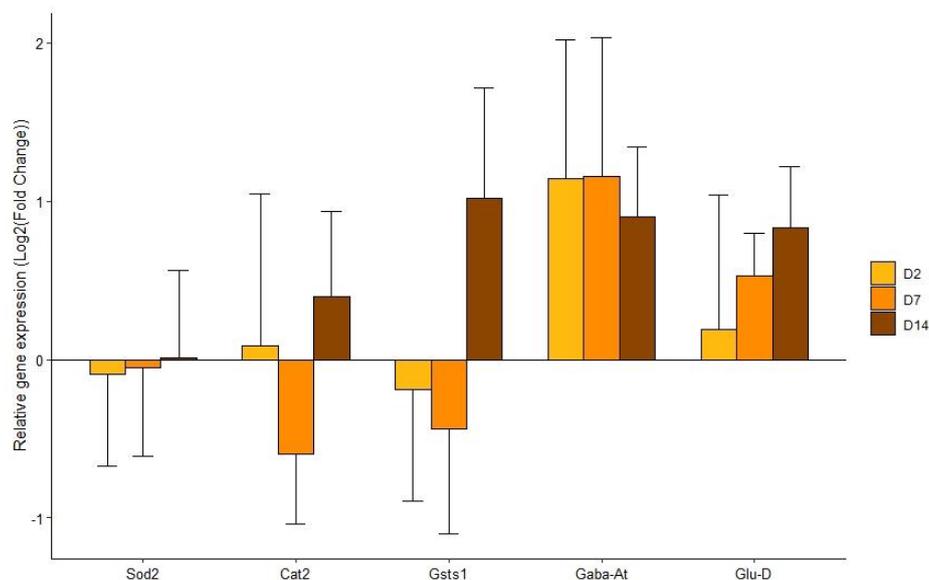


Figure 5. Evolution of the five key genes relative expression over the time in the control condition. *Sod2*: superoxide dismutase 2; *Cat2*: catalase 2; *Gsts1*: glutathione-S-transferase S1; *Gaba-At*: GABA aminotransferase; *Glu-D*: glutamate decarboxylase. For a given gene, no significant difference is observed between the different time point (p -value > 0.05 according to a pairwise Tukey test with Bonferroni adjustment).

3.2.3. Effect of the co-exposure on selected molecular descriptors.

The relative expression of the five selected key genes (*Sod2*, *Cat2*, *Gsts1*, *Gaba-At* and *Glu-D*) was measured at four time points (D0, D2, D7 and D14) for eight of the fifteen defined experimental conditions: Control, O3, O4, Fip0.5-O3, Fip0.5-O4, Fip1-O3 and Fip1-O4. These conditions were selected because 1-octen-3-ol concentrations represents the molar equivalents of the fipronil concentrations used arguing a potential mechanism of competition (between the VOC and the insecticide) for GABA-R.

Expression of the targeted genes was stable over the time in the control condition (p -value > 0.05, Tukey test with Bonferroni adjustment) (**Figure 5**). From an overall point of view, whatever the gene considered no treatment effect was demonstrated by Scheirer-Ray-Hare test (p -value > 0.05) (**Table S1**), between the different exposed and co-exposed conditions. This

result was confirmed by Mann-Whitney tests with Bonferroni adjustment (p -value > 0.05) (Table S2). Conversely, whatever the gene considered an exposure time effect was always observed (p -value < 0.05, Scheirer-Ray-Hare tests) (Table S1). The exposure time effect was confirmed by Dunn tests with Bonferroni adjustment (p -value < 0.05) (Table 3). In the case of exposed and co-exposed conditions, exposure time had a greater influence on targeted genes expression than the treatment itself.

Table 3. Pairwise Dunn tests (with Bonferroni adjustment) results. Following the Scheirer-Ray-Hare tests, pairwise Dunn tests were performed to assess the source of the time of exposure effect. For a given gene, when p -value is marked in red there is a difference in relative gene expression between the two compared time points.

Condition	Comparison	<i>Sod2</i>	<i>Cat2</i>	<i>Gsts1</i>	<i>Gaba-At</i>	<i>Glu-D</i>
O3	D2/D7	1	0.1184	0.0723	1	0.0427
	D2/D14	0.4240	0.2327	0.1873	1	0.8422
	D7/D14	0.7179	1	1	1	0.5094
O4	D2/D7	1	0.7179	0.3499	1	0.2327
	D2/D14	1	0.7179	0.0723	1	1
	D7/D14	1	1	1	1	1
Fip0.5	D2/D7	1	0.5094	0.0427	0.9804	0.9804
	D2/D14	1	0.3499	0.8422	1	0.8422
	D7/D14	1	1	0.5094	1	1
Fip1	D2/D7	1	0.3499	0.1184	1	1
	D2/D14	1	0.0723	1	0.8422	0.3209
	D7/D14	1	1	0.7179	0.1873	1
Fip0.5-O3	D2/D7	0.3499	1	1	0.0181	0.7179
	D2/D14	0.8422	0.1873	1	1	0.2327
	D7/D14	1	0.8422	1	0.1496	1
Fip0.5-O4	D2/D7	0.4240	0.0929	0.0558	0.9234	0.4240
	D2/D14	1	0.0323	1	1	1
	D7/D14	0.7179	1	0.2327	1	1
Fip1-O3	D2/D7	0.3499	0.0427	0.1184	0.5094	0.0723
	D2/D14	0.0723	0.0723	1	0.1873	0.0427
	D7/D14	1	1	0.0243	1	1
Fip1-O4	D2/D7	1	0.4240	0.0324	0.5094	0.3499
	D2/D14	0.0243	0.0558	0.3499	0.0071	0.0051
	D7/D14	0.2327	1	0.9804	0.2866	0.3499

In this work, expression of a target gene was considered to be modulated if $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) > 1$ (overexpression relative to the control group) or if $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) < -1$ (underexpression relative to the control condition). No change in the expression of the gene encoding superoxide dismutase 2 (*Sod2*) was observed (Figure S4A). Overexpression of the gene encoding catalase 2 (*Cat2*) was demonstrated in Fip0.5-O4 condition at times D7 and D14,

Fip1-O3 at time D7 and Fip1-O4 at time D14, while underexpression was observed for the O3 group at time D2 (**Figure S4B**). Overexpression of glutathione-S-transferase S1 (*Gsts1*) gene was observed in the Fip0.5, Fip1, Fip1-O3 and Fip1-O4 groups at the time D7, while underexpression was observed in the O4 group at time D14 (**Figure S4C**). Overexpression of the genes encoding GABA aminotransferase (*Gaba-At*) and glutamate decarboxylase (*Glu-D*) was demonstrated for the Fip1-O4 group at time D14, while underexpression was observed at time D2 for the same group (**Figures S4D and E**).

Discussion

No reduction in survival was observed in *A. mellifera* exposed for 21 days to different concentrations of 1-octen-3-ol or 2,6-dimethylcyclohexanol. These two VOCs show no toxic effect at the tested concentrations (based on survival descriptor). Survival rates of bees exposed to 1-octen-3-ol are more uniform than those obtained for 2,6-dimethylcyclohexanol. The latter also showed higher observed mortality than 1-octen-3-ol. Bee sensitivity to the two VOCs seems to differ. This difference could be explained by toxicokinetic parameters, different target sites or even the same target site having a different affinity for the two compounds. As 1-octen-3-ol has less observed effects on bees than 2,6-dimethylcyclohexanol, it was chosen for further experiments.

Survival data obtained in the context of co-exposures suggest a beneficial effect of 1-octen-3-ol on the survival of *A. mellifera* chronically exposed to low doses of fipronil. Improvement in survival was about $25.7 \pm 2.9\%$ for bees co-exposed with $0.5 \mu\text{g/L}$ of fipronil and $21.3 \pm 9.4\%$ for those co-exposed with $1 \mu\text{g/L}$ of fipronil. As proposed by Fernandes and collaborators (2023) [30], 1-octen-3-ol may exert a GABA-R activating activity, as demonstrated in mammal [34]. A mechanism of competition for GABA-R, between the VOC and the insecticide, could thus be established. Fipronil induces a prolonged closure of chloride channels resulting in hyperexcitability of the nervous system [7,17], which could be compensated by the binding of 1-octen-3-ol. The binding of this VOC would induce a prolonged opening period of the GABA-R channels. 1-octen-3-ol could have a threshold effect on GABA-R, since no dose-response effect has been demonstrated (the observed beneficial effect is not influenced by the VOC concentration).

Nevertheless, it cannot be excluded that the improvement in bee survival was an indirect effect of 1-octen-3-ol exposure. The VOC could exert a hormetic effect and induce an overall

improvement in bee fitness, enabling them to respond better to insecticide stress. Fipronil causes a variety of sublethal effects, 1-octen-3-ol could protect bee from these effects. Da Silva Cruz *et al.* (2010) [40] demonstrated damage to intestinal epithelial cells in bees exposed to fipronil, Zaluski and colleagues (2020) [19] showed a decrease in enzyme involved in energy metabolism, while Nicodemo and collaborators (2014) [18] observed an impact on mitochondrial activity. These impacts can affect the bee physiology by reducing nutrient absorption and metabolization. It has been shown in *Penicillium chrysogenum* that an artificial exposure to 1-octen-3-ol alters the expression pattern of genes involved in primary metabolism and in secondary metabolites biosynthesis. In a normal physiological context, endogenous production of this VOC by the fungus regulates sporulation and germination processes [41]. The alga *Macrocystis pyrefera* is also a natural producer of 1-octen-3-ol, and an artificial exposure to this VOC alters the expression profile of genes involved in lipid metabolism and oxidative stress management (the role of this VOC in normal physiological context remain unknown) [42]. These effects of 1-octen-3-ol, observed on various organism, can be transposed to a protective effect in *A. mellifera*. The VOC hormetic effect could be mediate by modulation of gene expression involved in primary metabolism or by limiting the effect of oxidative stress, leading to a better overall insect fitness and hence a better survival in bees under insecticidal stress.

Five genes were selected for their implication in response to toxic stress (oxidative stress management and xenobiotic metabolism) and in regulation of GABAergic signalling (GABA metabolism). Expression of the five genes studied was not associated with a treatment effect. However, a time of exposure effect was observed, although this was generally associated with the highest VOC and/or insecticide concentrations. Genes encoding oxidative stress management enzymes (*Sod2*, *Cat2*) showed an expression profile indicating the generation of oxidative stress over the time, as highlighted in previous studies [43–45]. However, this modulation in gene expression remains weak and suggests either a very limited stress in the bees head or a stress efficiently managed by the pool of enzymes already present in the tissue. The detoxication pathway mediated by glutathione-S-transferase S1 appears to be involved only after 7 days of exposure to fipronil, suggesting a potential detoxification process that takes a delayed time to set up in *A. mellifera* head. Moreover, the enzyme does not appear to be produced continuously, as gene expression returns to control level after 14 days of chronic exposure. In honeybees, detoxification processes are mainly studied in the abdomen where the majority of fat bodies are found, so it is possible that these cellular processes are weak in the head. Regarding *A. mellifera* as one of the insects with the fewest genes involved in xenobiotics

metabolism [46,47], it would be interesting to study the expression of genes other than *Gsts1* (carboxylesterases, cytochrome P₄₅₀ monooxygenases) in the head to assess whether there is a preferential detoxification pathway in this tissue. It was assumed in this work that exposure to fipronil could influence the GABA anabolism (*via* glutamate decarboxylase, a lyase catalysing the conversion of L-glutamate to GABA) and that the exposure to 1-octen-3-ol could influence the GABA catabolism (*via* GABA aminotransferase, a transferase catalysing the reaction $\text{GABA} + \text{oxoglutarate} \rightleftharpoons \text{L-glutamate} + \text{succinate semialdehyde}$). No effect was observed on the expression of these two key GABA metabolism genes. This metabolic pathway has been less studied in animals (outside pathological context), but is extensively studied in plants notably in stress response [48–50]. In plants, the expression of these genes is finely regulated and is low under normal physiological conditions, with a functional pool of intracellular enzymes that persists over the time. In *A. mellifera*, it is possible that these genes are regulated in the same way. Genes encoding these enzymes are not ready to be expressed in a large amount to respond to a stress, since an intracellular pool of enzymes is present. This would explain the absence of variation in genes expression in bees head.

The expression of the selected genes in the head does not allow them to be considered as descriptors of the effects associated with fipronil exposure or co-exposure with the VOC. The failure to show variations in the expression of these genes does not mean that bees haven't developed molecular mechanisms to respond to the stress induced by the different exposure conditions. Transcriptional study was carried out with RNAs extracted from the whole head, which may have masked the specific transcriptional response of cerebral ganglia. It would therefore be interesting to repeat this experiment targeting more precisely the cerebral ganglia or the abdominal nerve ganglia to focus on the nerve tissues response.

The aim of this work was to study the potential beneficial effect of two VOCs isolated from the bee volatolome. A beneficial effect of 1-octen-3-ol on survival was observed in bees presenting high inherent sensitivity. It would be interesting to repeat this experiment using 1-octen-3-ol with less sensitive bees, to show whether this effect on survival remains significant. And then to show whether the results obtained are reproducible, although *A. mellifera* is an (eco)toxicological model for which data reproducibility is always a challenge [13]. These experiments could also be repeated using 2,6-dimethylcyclohexanol (to assess whether it also has a beneficial effect) or replacing fipronil by another compound acting on GABA-Rs like compounds from avermectin family (ivermectin and abamectin for example, which acts on GABA-Rs in the peripheral nervous system) to assess if 1-octen-3-ol retains its beneficial effect on survival. It also seems essential to understand the molecular, cellular and physiological

mechanisms involved. As first step, it would be relevant to study the kinetics (absorption, distribution, metabolization, excretion) of the VOC and/or fipronil in bees using ^{14}C labelled compounds. It would be also interesting to determine whether 1-octen-3-ol actually interacts with GABA-Rs in *A. mellifera* and whether it competes with fipronil for these receptors. This information, derived from cell culture and/or electrophysiology approaches, would enable to understand whether 1-octen-3-ol exert a direct effect (interaction with GABA-Rs) or a hormetic effect (overall improvement in fitness) in honeybees. While this study was focused on the presence of a potential “therapeutic” effect of the VOC, it would be relevant to assess whether this VOC also exert a “prophylactic” effect in bees, by carrying out successive exposures separated in time rather than co-exposures. Approaches under semi-field conditions (incorporating new descriptors such as behavioural) could be developed to test the potential beneficial effect of 1-octen-3-ol at the hive level and determine potential application for this compound in beekeeping.

Author information

Corresponding author

Philippe Bouchard

Laboratoire Microorganismes, Génome et Environnement, UMR 6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, 63170 Aubière, France

Email: philippe.bouchard@uca.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Funding

This research was funded by the UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement and by the French Federation for Environmental Researches.

References

1. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A: **Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards.** *Interdiscip Toxicol* 2009, **2**:1–12.
2. Sánchez-Bayo F: **Chapter 4 Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems.** In *Ecological Impacts of Toxic Chemicals.* . 2011:63–87.
3. Casida JE, Bryant RJ: **The ABCs of pesticide toxicology: Amounts, biology, and chemistry.** *Toxicol Res (Camb)* 2017, **6**:755–763.
4. Casida JE: **Pest toxicology: The primary mechanisms of pesticide action.** *Chem Res Toxicol* 2009, **22**:609–619.
5. Schafer RB, van den Brink PJ, Liess M: **Chapter 6 Impacts of pesticides on freshwater ecosystems.** In *Ecological Impacts of Toxic Chemicals.* . 2011:111–137.
6. VanEngelsdorp D, Meixner MD: **A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them.** *J Invertebr Pathol* 2010, **103**:S80–S95.
7. Johnson RM: **Honey bee toxicology.** *Annu Rev Entomol* 2015, **60**:415–434.
8. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE: **Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers.** *Trends Ecol Evol* 2010, **25**:345–353.
9. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL: **Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers.** *Sci express* 2015,
10. Douglas MR, Sponsler DB, Lonsdorf E V., Grozinger CM: **County-level analysis reveals a rapidly shifting landscape of insecticide hazard to honey bees (*Apis mellifera*) on US farmland.** *Sci Rep* 2020, **10**:1–11.
11. Saeed A, Larik FA, Channar PA: **Recent synthetic approaches to fipronil, a super-effective and safe pesticide.** *Res Chem Intermed* 2016, **42**:6805–6813.
12. Gibbons D, Morrissey C, Mineau P: **A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife.** *Environ Sci Pollut Res* 2015, **22**:103–118.
13. Pisa LW, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Downs CA, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Mcfield M, *et al.*: **Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates.** *Environ Sci Pollut Res* 2015, **22**:68–102.
14. Afssa, Afsse: **Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil - Synthèse et conclusion du rapport du groupe de travail : L' exposition au fipronil pourrait-elle entraîner un risque pour l' Homme ?** 2005,
15. Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM: **The sublethal effects of pesticides on**

- beneficial arthropods.** *Annu Rev Entomol* 2007, **52**:81–106.
16. ANSES: *Fipronil-Phytopharmacovigilance*. 2018.
 17. Casida JE, Durkin KA: **Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects.** *Annu Rev Entomol* 2013, **58**:99–117.
 18. Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HCD, Guelfi M, Balieira KVB, De Jong D, Mingatto FE: **Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity.** *Environ Toxicol Chem* 2014, **33**:2070–2075.
 19. Zaluski R, Bittarello AC, Vieira JCS, Braga CP, Padilha P de M, Fernandes M da S, Bovi T de S, Orsi R de O: **Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides.** *Sci Rep* 2020, **10**:1–11.
 20. Astolfi A, Kadri SM, de Castro Lippi IC, Mendes DD, Alonso DP, Ribolla PEM, de Oliveira Orsi R: **Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*.** *Apidologie* 2022, **53**:69.
 21. Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Cousin M, Sénéchal J, Benet P, Kretzschmar A, Belzunces LP, *et al.*: **Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential.** *Sci Rep* 2016, **6**:1–12.
 22. Kairo G, Biron DG, Ben Abdelkader F, Bonnet M, Tchamitchian S, Cousin M, Dussaubat C, Benoit B, Kretzschmar A, Belzunces LP, *et al.*: ***Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology.** *Sci Rep* 2017, **7**:1–14.
 23. Zaluski R, Kadri SM, Alonso DP, Martins Ribolla PE, de Oliveira Orsi R: **Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses.** *Environ Toxicol Chem* 2015, **34**:1062–1069.
 24. Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP: **A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides.** *Arch Environ Contam Toxicol* 2004, **47**:387–395.
 25. El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C: **Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*).** *Pharmacol Biochem Behav* 2005, **82**:30–39.
 26. Decourtye A, Lefort S, Devillers J, Gauthier M, Aupinel P, Tisseur M: **Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex**

- maze.** *Julius-Kühn-Archiv* 2009, **423**:75–83.
27. Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N: **The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*.** *Microbes Environ* 2019, **34**:226–233.
 28. Broza YY, Mochalski P, Ruzsanyi V, Amann A, Haick H: **Hybrid Volatolomics and Disease Detection.** *Angew Chemie - Int Ed* 2015, **54**:11036–11048.
 29. Giannoukos S, Agapiou A, Brkić B, Taylor S: **Volatolomics: A broad area of experimentation.** *J Chromatogr B* 2019, **1105**:136–147.
 30. Fernandes V, Hidalgo K, Diogon M, Mercier F, Angénieux M, Ratel J, Delbac F, Engel E, Bouchard P: **A GABA receptor modulator and semiochemical compounds evidenced using volatolomics as candidate markers of chronic exposure to fipronil in *Apis mellifera*.** *Metabolites* 2023, **13**.
 31. Hall AC, Griffith TN, Tsikolia M, Kotey FO, Gill N, Humbert DJ, Watt EE, Yermolina YA, Goel S, El-Ghendy B, *et al.*: **Cyclohexanol analogues are positive modulators of GABA A receptor currents and act as general anaesthetics *in vivo*.** *Eur J Pharmacol* 2011, **667**:175–181.
 32. Chowdhury L, Croft CJ, Goel S, Zaman N, Tai ACS, Walch EM, Smith K, Page A, Shea KM, Hall CD, *et al.*: **Differential potency of 2,6-dimethylcyclohexanol isomers for positive modulation of GABA A receptor currents.** *J Pharmacol Exp Ther* 2016, **357**:570–579.
 33. Hossain SJ, Aoshima H, Koda H, Kiso Y: **Effects of coffee components on the response of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes.** *J Agric Food Chem* 2003, **51**:7568–7575.
 34. Johnston G A R: **Receptor channel pharmacology.** *Receptor* 2006,
 35. Köksal B: **Cytotoxic and neurotoxic effects of 1-octen-3-ol on learning and memory functions of brain.** *Adv Biol Res* 9 2015, **9**:444–448.
 36. Hall AC, Griffith TN, Tsikolia M, Kotey FO, Gill N, Humbert DJ, Watt EE, Yermolina YA, Goel S, El-Ghendy B, *et al.*: **Cyclohexanol analogues are positive modulators of GABA A receptor currents and act as general anaesthetics *in vivo*.** *Eur J Pharmacol* 2011, **667**:175–181.
 37. Jeon JH, Moon KH, Kim YH, Kim YH: **Reference gene selection for qRT-PCR analysis of season- and tissue-specific gene expression profiles in the honey bee *Apis mellifera*.** *Sci Rep* 2020, **10**:1–13.
 38. Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N:

- Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides.** *PLoS One* 2014, **9**:1–12.
39. Paris L, Roussel M, Pereira B, Delbac F, Diogon M: **Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fipronil.** *Microb Biotechnol* 2017, **10**:1702–1717.
 40. Da Silva Cruz A, Da Silva-Zacarin ECM, Bueno OC, Malaspina O: **Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae.** *Cell Biol Toxicol* 2010, **26**:165–176.
 41. Yin G, Zhang Y, Fu M, Hua SST, Huang Q, Pennerman KK, Wu G, Jurick WM, Lee S, Bu L, *et al.*: **Influence of R and S enantiomers of 1-octen-3-ol on gene expression of *Penicillium chrysogenum*.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 2019, **46**:977–991.
 42. Zhang X, Zhang J, Wang Y, Xu D, Fan X, Zhang Y, Ma J, Ye N: **The oxylipin messenger 1-octen-3-ol induced rapid responses in kelp *Macrocystis pyrifera*.** *Physiol Plant* 2021, **172**:1641–1652.
 43. Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, Brunet JL, Badiou-Beneteau A: **Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides.** *Environ Toxicol Chem* 2013, **32**:2117–2124.
 44. Roat TC, Carvalho SM, Nocelli RCF, Silva-Zacarin ECM, Palma MS, Malaspina O: **Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees.** *Arch Environ Contam Toxicol* 2013, **64**:456–466.
 45. Roat TC, Carvalho SM, Palma MS, Malaspina O: **Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil.** *Environ Toxicol Chem* 2017, **36**:1652–1660.
 46. Berenbaum MR, Johnson RM: **Xenobiotic detoxification pathways in honey bees.** *Curr Opin Insect Sci* 2015, **10**:51–58.
 47. Gong Y, Diao Q: **Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees.** *Ecotoxicology* 2017, **26**:0–1.
 48. Bouché N, Fromm H: **GABA in plants: Just a metabolite?** *Trends Plant Sci* 2004, **9**:110–115.
 49. Li L, Dou N, Zhang H, Wu C: **The versatile GABA in plants.** *Plant Signal Behav* 2021, **16**.
 50. Guo Z, Gong J, Luo S, Zuo Y, Shen Y: **Role of gamma-aminobutyric acid in plant defense response.** 2023,

Supplementary material

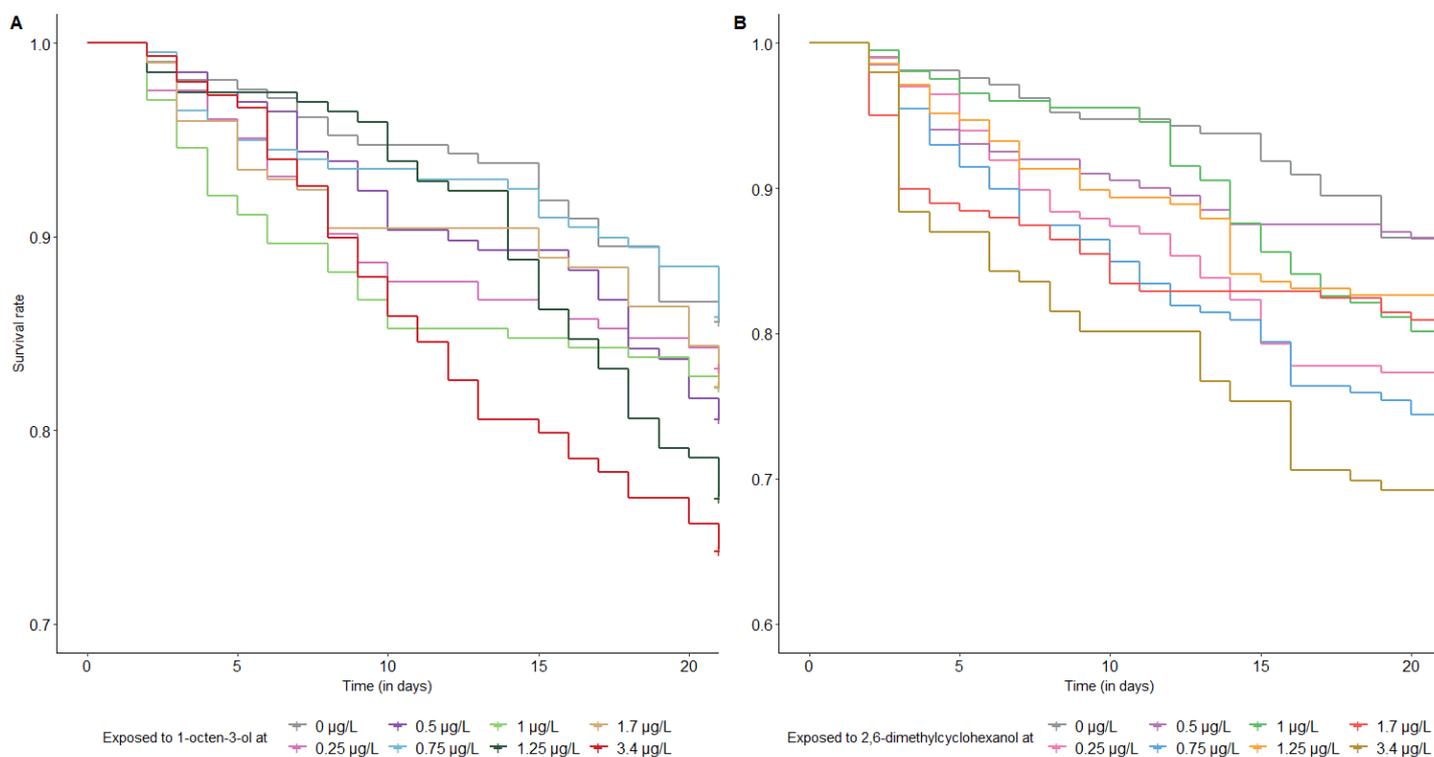


Figure S1. Survival of honeybees chronically exposed to 1-octen-3-ol (A) or 2,6-dimethylcyclohexanol (B). Honeybees were exposed to the indicated concentrations of VOCs through sucrose feeding *ad libitum* and their proportion of survival was monitored by Kaplan-Meier estimator ($n = 150$ to 200 bees per condition). The Cox-Mantel test performed on the Kaplan-Meier distributions shows a significant decrease in survival of bees exposed to 1-octen-3-ol at 1.25 and 3.4 $\mu\text{g/L}$ compared to the unexposed control group (with p -value = 0.0225 and 0.005 respectively). The statistical analysis also shows a significant decrease in survival of bees exposed to 2,6-dimethylcyclohexanol at 0.25 , 0.75 and 3.4 $\mu\text{g/L}$ compared to the unexposed control group (with p -value = 0.0024 , 0.003 and < 0.001 respectively).

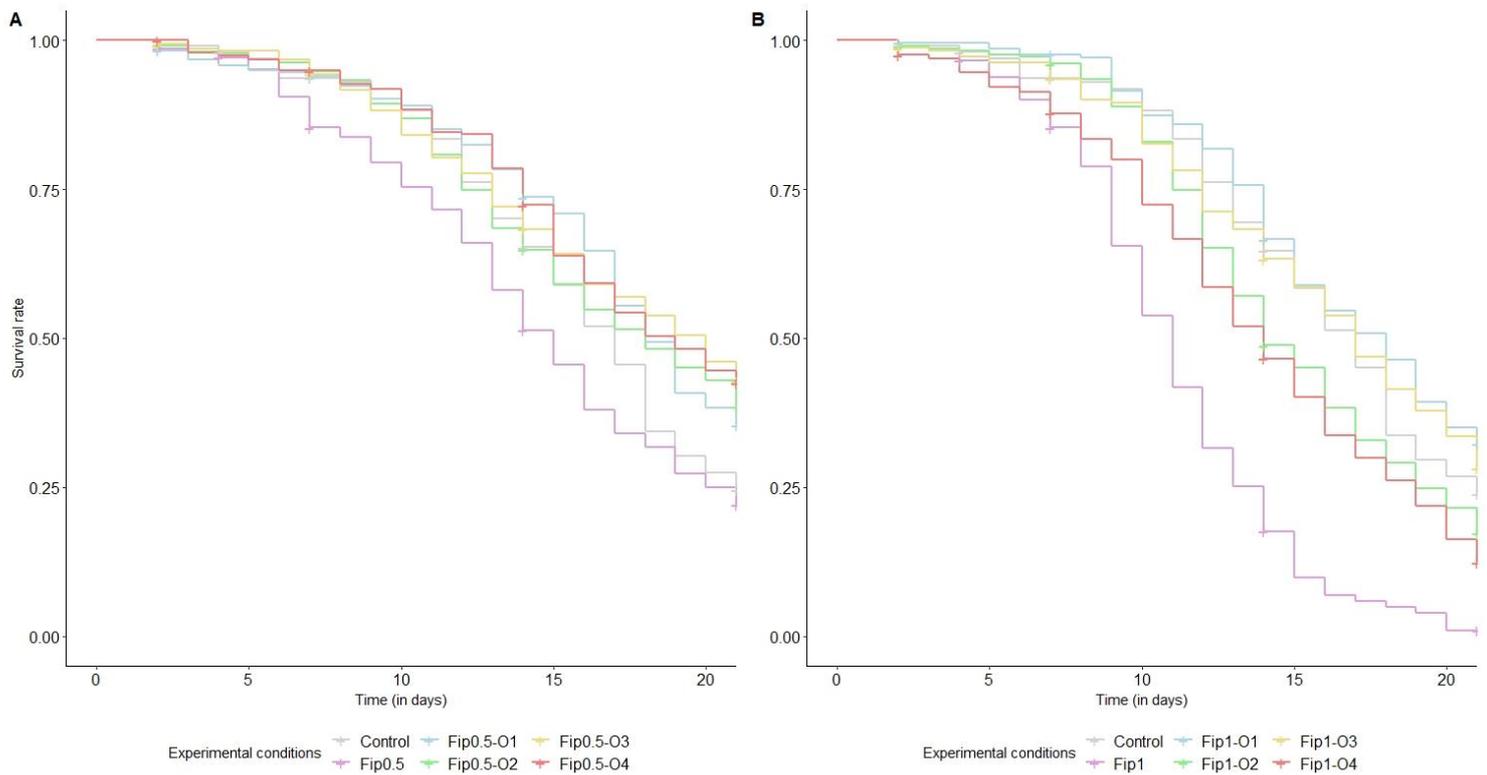


Figure S2. Survival of honeybees chronically co-exposed to 1-octen-3-ol and fipronil at 0.5 µg/L (**A**) or 1 µg/L (**B**). Honeybees were exposed through sucrose feeding *ad libitum* and their proportion of survival was monitored by Kaplan-Meier estimator ($n = 210$ to 280 bees per condition). The Cox-Mantel test performed on the Kaplan-Meier distributions shows a significant increase in survival of bees co-exposed to fipronil at 0.5 µg/L and 1-octen-3-ol compared to fipronil exposed group (with a p -value < 0.0001 for each comparison). The statistical analysis shows the same pattern for honeybees co-exposed to fipronil at 1 µg/L and 1-octen-3-ol compared to fipronil exposed group (with a p -value < 0.0001 for each comparison).

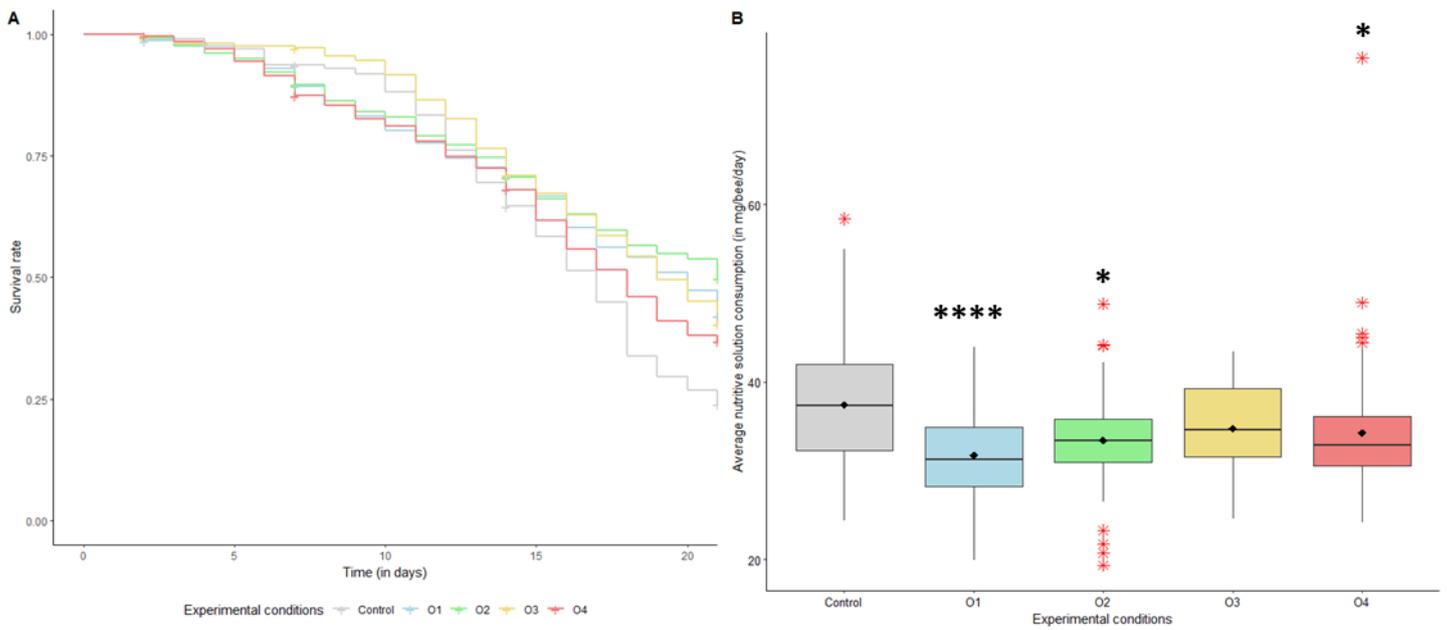


Figure S3. (A) Effect of chronic exposure to different 1-octen-3-ol concentrations on the survival rate of *A. mellifera*. The Cox-Mantel test performed on the Kaplan-Meier distributions shows a significant increase in survival of bees exposed to 0.5, 1 and 1.7 $\mu\text{g/L}$ of 1-octen-3-ol compared to the control group (with $p\text{-value} = 0.003, < 0.0001$ and 0.003 respectively). **(B)** Box-plots representing the average daily consumption by bees of a 50% sucrose solution under different exposure conditions to 1-octen-3-ol. Black diamonds represent the average daily consumption of each group, the black horizontal bar represents the median and red asterisks represent outlier values. Differences in daily food intake, by comparison with the control group, are represented by black asterisks ($p\text{-value} < 0.05$ according to a pairwise Dunn test with Bonferroni adjustment).

Table S1. Scheirer-Ray-Hare tests results.

Factor	Df	<i>Sod2</i>	<i>Cat2</i>	<i>Gsts1</i>	<i>Gaba-At</i>	<i>Glu-D</i>
Treatment	7	0.2669	0.5023	0.6175	0.6955	0.5786
Time of exposure	2	0.0368	< 0.0001	< 0.0001	0.0051	< 0.0001
Interaction	14	0.2019	0.9538	0.3042	0.0039	0.3058

Table S2. Mann-Whitney tests (with Bonferroni adjustment) results. Following the Scheirer-Ray-Hare tests, pairwise Mann-Whitney tests were performed to confirm the absence of treatment effect. No significant difference is observed by comparison of two experimental condition for a given gene and a given time point (*P-value* > 0.05).

Comparison	Time point	<i>Sod2</i>	<i>Cat2</i>	<i>Gsts1</i>	<i>Gaba-At</i>	<i>Glu-D</i>
O3/Fip0.5-O3	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	0.801	1
	D14	1	1	1	1	1
O3/Fip1-O3	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	1	1	1	1
O4/Fip0.5-O4	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	1	1	1	1
O4/Fip1-O4	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	1	1	1	1
Fip0.5/Fip0.5-O3	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	0.801	1
	D14	1	1	1	1	1
Fip0.5/Fip0.5-O4	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	1	1	1	1
Fip1/Fip1-O3	D2	1	1	1	1	1
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	1	0.801	1	1
Fip1/Fip1-O4	D2	1	1	1	1	0.801
	D7	1	1	1	1	1
	D14	1	0.801	1	0.801	0.801

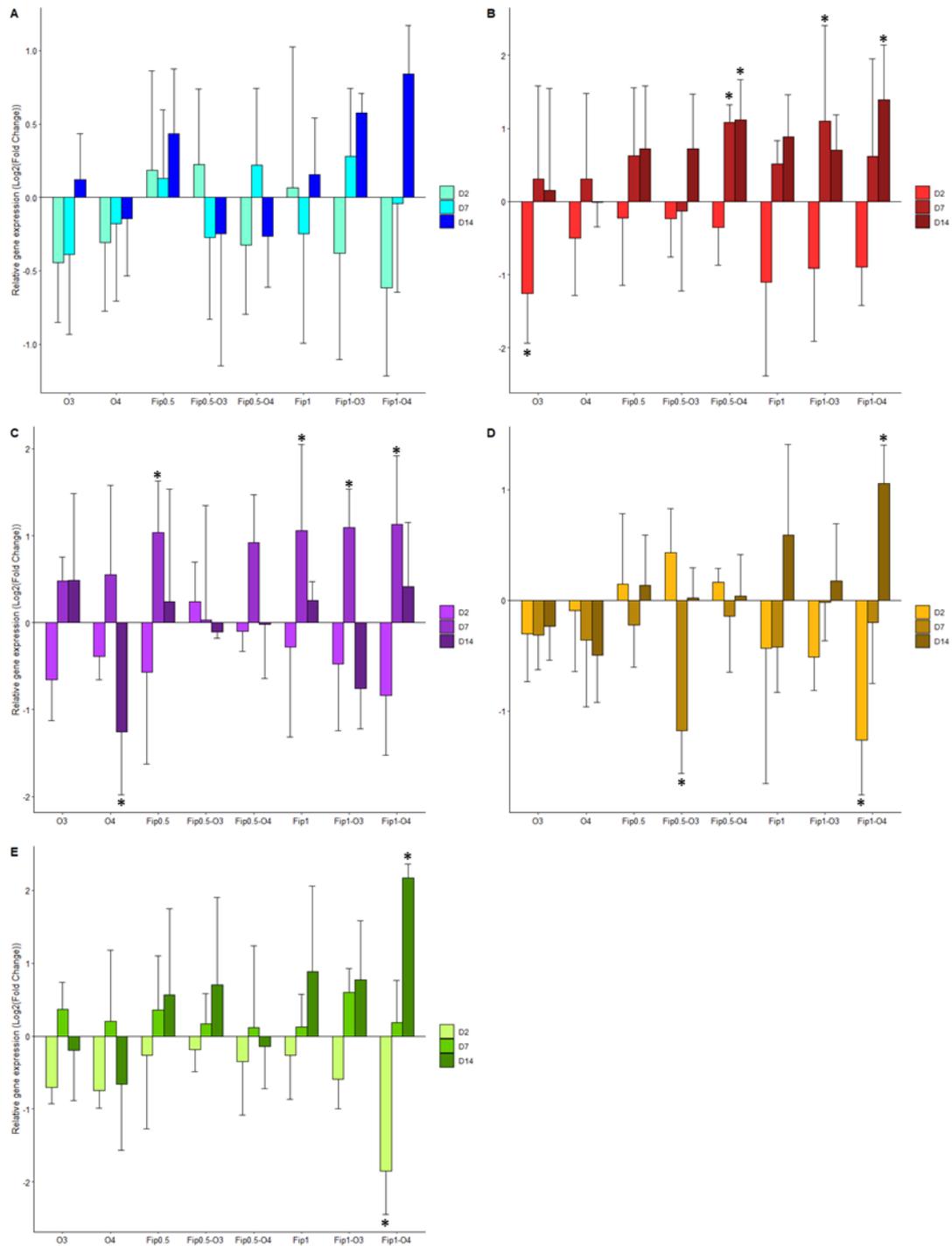


Figure S4. Relative expression of *Sod2* (A), *Cat2* (B), *Gsts1* (C), *Gaba-At* (D) and *Glu-D* (E) genes in bees heads as a function of the different experimental conditions and time. A significant overexpression is characterized by a $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) > 1$ and a significant underexpression by a $\text{Log}_2(\text{Fold Change}) < -1$. Differences in relative gene expression, by comparison with the control condition, are represented by black asterisks.

III. Résultats marquants, discussion et conclusions :

L'exposition chronique aux deux COV, sur la gamme de concentrations utilisées (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,7 et 3,4 $\mu\text{g/L}$), n'a pas d'effet sur la survie de *A. mellifera*. Les deux composés n'ont donc pas d'effets toxiques induisant une surmortalité des abeilles (aux concentrations testées). Contrairement au 1-octen-3-ol, une exposition chronique des abeilles au 2,6-diméthylcyclohexanol entraîne une diminution de leur consommation journalière moyenne en solution nutritive. La modification du comportement alimentaire induite par ce COV ne semble pas avoir d'impact sur l'abeille. Il est toutefois difficile d'affirmer avec certitude que ce COV a un effet répulsif ou de coupe faim. La mortalité observée dans le cas d'une exposition au 2,6-diméthylcyclohexanol est globalement supérieure à celle observée pour le 1-octen-3-ol. La sensibilité des abeilles pour ces deux COV semble donc différente. Cette différence pourrait être expliquée par trois éléments : des paramètres toxicocinétiques différents entre les deux COV, des sites cibles différents (soit vis-à-vis des GABA-R soit vis-à-vis de sites cibles secondaires inconnus) ou par une différence d'affinité du site cible pour les deux composés. Au vu des résultats sur la toxicologie de ces deux COV, le 1-octen-3-ol a été sélectionné pour poursuivre les expérimentations visant à mettre en évidence un potentiel effet bénéfique chez l'abeille exposée au fipronil.

Dans le cadre de l'expérience de co-exposition, une importante fragilité a été observée chez les abeilles utilisées (baisse du taux de survie de $77,8 \pm 7\%$ pour la condition contrôle). Les abeilles utilisées dans cette expérimentation présentent donc une fragilité inhérente qui est probablement en lien avec leur statut sanitaire (présence de parasites ou de virus par exemple). Il faut donc retenir que ce paramètre de fragilité est le même pour toutes les abeilles considérées et représente un statut expérimental initial. Malgré cela, le 1-octen-3-ol présente un effet bénéfique sur la survie des abeilles lorsqu'elles sont exposées à de faibles doses de fipronil, même si aucun effet dose-réponse n'a pu être mis en évidence (l'amélioration de la survie n'est donc pas liée à la concentration de 1-octen-3-ol utilisée). Une augmentation du taux de survie à 21 jours de $25,7 \pm 2,9\%$ a été observé pour les abeilles co-exposées avec 0,5 $\mu\text{g/L}$ de fipronil et de $21,3 \pm 9,4\%$ pour les abeilles co-exposées avec 1 $\mu\text{g/L}$ de fipronil. Séparément, le fipronil et le 1-octen-3-ol n'induisent pas de modification de la prise alimentaire journalière. En revanche, dans le cas d'une co-exposition, une diminution de la consommation moyenne journalière de solution nutritive a été observée. Cette baisse ne suffit, cependant, pas à elle seule à expliquer l'amélioration de la survie observée (à la fin de l'expérience les abeilles exposées et co-exposées ont *a posteriori* ingérées la même quantité de xénobiotiques). Cette diminution

de la consommation a également été observée dans des travaux préliminaires (données non-publiées) dans le cas de co-exposition entre le fipronil (0,5 µg/L) et le 2,6-diméthylcyclohexanol (0,5 µg/L) indiquant que cette baisse ne semble pas être spécifique à la co-exposition fipronil/1-octen-3-ol. Comme évoqué dans une première analyse de volatolomique (Fernandes *et al.*, 2023) et démontré chez les mammifères (Johnston, 2006), le 1-octen-3-ol pourrait activer les GABA-R. Un mécanisme de compétition entre le COV et l'insecticide pour le récepteur est donc envisageable. La fermeture des canaux chlorure due au fipronil (Casida and Durkin, 2013; Johnson, 2015) pourrait alors être limitée par la liaison du 1-octen-3-ol (ouverture prolongée des canaux). Le 1-octen-3-ol pourrait avoir un effet seuil sur les GABA-R puisqu'aucun effet dose-réponse n'a pu être mis en évidence dans cette étude, l'effet bénéfique observé n'est pas associé à la concentration en COV administrée. Cependant, un effet indirect du COV sur l'amélioration de la survie des abeilles n'est pas à exclure. En effet, le 1-octen-3-ol pourrait exercer un effet hormétique et conduire à une amélioration globale de la *fitness* des abeilles. Chez d'autres organismes il a été montré qu'une exposition au 1-octen-3-ol pouvait moduler l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme primaire et dans la biosynthèse de métabolites secondaires mais également de gènes impliqués dans la gestion du stress oxydatif (Yin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Aucun effet, quel que soit le traitement, n'a été observé sur l'expression des gènes clés sélectionnés dans les têtes d'abeille. Ces gènes ne peuvent donc pas servir de descripteurs moléculaires témoignant du potentiel effet bénéfique du 1-octen-3-ol. L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée en utilisant l'ensemble des ARN présents dans la tête des abeilles, il serait intéressant de réaliser une étude d'expression sur ces gènes au niveau des ganglions cérébroïdes pour avoir une réponse plus spécifique de ce tissu que l'on suppose riche en GABA-R.

*Chapitre n°4 Le gène *tspo* :
un biomarqueur potentiel du
stress pesticide chez
Pseudomonas fluorescens ?*

I. Introduction :

Titre :

Le gène *tspo*, un biomarqueur du stress pesticide chez la bactérie édaphique *Pseudomonas fluorescens* (souche SG-1).

Résumé français :

La réponse transcriptomique du protiste cilié *Paramecium tetraurelia* a été étudiée (ADN microarray) après une exposition de 72h à une faible dose de deltaméthrine (insecticide pyréthrinoïde, données non-publiées). Les analyses ont révélées la modulation de l'expression des gènes associés à une réponse toxique généraliste (gènes impliqués dans réponse aux stimuli et processus métaboliques). Un gène, codant pour la protéine membranaire TranSlocator PrOtein (TSPO), a été le plus surexprimé (plus de 10 fois) en présence de deltaméthrine et pourrait être considéré comme un marqueur potentiel de l'exposition aux pyréthrinoïdes chez cet organisme. Ce gène a été mis en évidence pour la première fois chez les protistes, faisant de la famille *tspo* une famille génique ubiquitaire (présente dans tous les domaines du vivant). Le gène codant la protéine TSPO a été identifié chez *Pseudomonas fluorescens* et son expression suivie par RT-qPCR et ddPCR après exposition à faibles doses (Concentration Efficace 10% sur le temps de génération) d'une gamme élargie d'insecticides pyréthrinoïdes ou de pesticides (insecticides, herbicides et fongicides). Nous postulons que TSPO pourrait être un potentiel marqueur à suivre dans le domaine de la toxicologie pour la détection et l'évaluation de l'exposition aux pyréthrinoïdes. Les approches de biologie moléculaire quantitatives ciblées montrent que l'expression du gène *tspo* est fortement diminuée en présence de faibles doses d'insecticides pyréthrinoïdes. Cette modulation de l'expression n'est pas propre à cette famille d'insecticides puisque d'autres pesticides sont capables de l'induire mais dans une moindre mesure.

Contexte de l'étude :

Etudier l'impact des pesticides sur les écosystèmes et leur fonctionnement est extrêmement complexe. Il est cependant possible de tenter d'extrapoler des informations en se basant sur un groupe d'organismes particuliers : les auxiliaires des écosystèmes. Le sol est un habitat hétérogène à la structure complexe. Il est caractérisé par une faible quantité de nutriments et des propriétés physico-chimiques variables donnant naissance à une importante diversité de micro-habitats. Ces micro-habitats sont colonisés par une grande diversité

d'organismes aux fonctions variées (Nannipieri *et al.*, 2003; Barrios, 2007; Peñuelas *et al.*, 2014; Wilpiseski *et al.*, 2019). La bactérie *Pseudomonas fluorescens* (γ -protéobactéries) est un bon exemple microbien d'auxiliaire des écosystèmes dans les sols puisqu'elle participe aux cycles biogéochimiques et est classée parmi les *Plant Growing Promoting Rhizobacteria* (Walsh *et al.*, 2001; Raaijmakers *et al.*, 2002; Couillerot *et al.*, 2009; Gera Hol *et al.*, 2013).

Une étude toxicogénomique (ADN microarray) réalisée au laboratoire (données non-publiées) a montré que le profil transcriptomique d'un microorganisme eucaryote modèle (*Paramecium tetraurelia*) pouvait permettre la mise en évidence de marqueurs témoignant d'une exposition à de faibles doses (Concentration Efficace 10% sur le temps de génération, CE10) de pesticides. Dans cette étude un gène montrait une forte sur-expression par rapport à la condition contrôle dans le cas d'une exposition (72h) à la deltaméthrine (insecticide de la famille des pyréthriinoïdes) : le gène *tspo*. Les protéines de la famille TSPO (*TranSlocator PrOtein*) représentent une très ancienne famille de protéines et sont actuellement présentes dans les trois domaines du vivant (Fan *et al.*, 2012; Fan and Papadopoulos, 2013). Cette famille est caractérisée par une très grande conservation structurale (cinq domaines transmembranaires liés les uns aux autres par des boucles) (Fan *et al.*, 2012; Batoko *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). La localisation et la fonction de la protéine ne sont, en revanche, pas conservées et sont variables en fonction de l'organisme considéré. Chez les bactéries, ce sont des protéines membranaires (Davey and De Bruijn, 2000; Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015) ayant différentes fonctions dont la gestion de la transition hétérotrophie-autotrophie chez *Rhodobacter sphaeroides* (Yeliseev and Kaplan, 1995, 1999, 2000; Zeng and Kaplan, 2001), le métabolisme des porphyrines chez différentes bactéries (Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015) ou encore la gestion de stress nutritionnels chez *Sinorhizobium meliloti* (Davey and De Bruijn, 2000). Des études ont été réalisées pour déterminer le rôle de cette protéine chez *P. fluorescens* mais actuellement il n'y a aucun consensus sur sa fonction (Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015).

Hypothèse de travail :

L'étude transcriptomique antérieure, réalisée sur *Paramecium tetraurelia*, a permis la mise en évidence du gène *tspo* comme marqueur génique du stress pyréthriinoïdes (deltaméthrine). Dans ce travail, nous avons supposé que ce gène pourrait également témoigner de l'exposition aux insecticides pyréthriinoïdes chez un autre auxiliaire des écosystèmes microbiens : la bactérie du sol *P. fluorescens*.

Objectifs de l'étude :

Deux principaux objectifs ont été développés dans cette étude :

- 1 - Analyser l'expression du gène *tspo* en présence de faibles doses (CE10 sur le temps de génération) d'insecticides pyréthrinoïdes chez la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens* SG-1 par une approche de qPCR.
- 2 - Evaluer le potentiel du gène *tspo* comme potentiel biomarqueur génique témoignant spécifiquement d'une exposition aux insecticides pyréthrinoïdes en mesurant son expression en présence de faibles doses de pesticides (hors pyréthrinoïdes) par une approche de ddPCR.

II. Article :

Fernandes, V.; Garcia, M.; Aubry, M.; Batisson, I. and Bouchard, P. The *tspo* gene, a biomarker of pesticides stress in the soil bacterium *Pseudomonas fluorescens* (strain SG-1). *In prep.*

The *tspo* gene, a biomarker of pesticides stress in the edaphic bacterium *Pseudomonas fluorescens* (strain SG-1)

Vincent Fernandes¹, Maxence Garcia, Mathilde Aubry, Jérôme Lesobre¹, Isabelle Batisson¹ et Philippe Bouchard^{1*}.

¹ Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Abstract

The transcriptomic response of the ciliated protist *Paramecium tetraurelia* was studied (DNA microarray) after a 72h exposure to a low dose of deltamethrin (pyrethroid insecticide, unpublished data). It revealed a modulation of genes expression, associated with a general toxic response (stimuli response and metabolic processes). One gene, encoding the membrane Translocator Protein (TSPO), was specially overexpressed (more than 10 times) in the presence of deltamethrin and could be considered as a potential marker of pyrethroids exposure in this organism. This gene was evidenced for the first time in protists, making the *tspo* gene family an ubiquitous gene family. The *tspo* gene was identified in *Pseudomonas fluorescens* and its expression was monitored by real-time PCR and digital droplet PCR following exposure to low doses (Effective Concentration 10% over the generation time) of a wide range of pyrethroids insecticides and other pesticides (insecticides, herbicides, fungicides). We postulate that TSPO could be a potential marker in toxicology for the detection and evaluation of pyrethroids exposure. The *tspo* gene expression is strongly down modulated in the presence of low doses of pyrethroids insecticides. This alteration in expression is not specific to this family of insecticides, since other pesticides are also associated with underexpression of *tspo* gene in a lesser extent. Given our current state of knowledge, it is clear that the behavior of the *tspo* gene is modified when bacterial cells are subjected to different types of pesticides. At first sight, this indicates that *tspo* cannot be considered as a biomarker of pyrethroid-specific exposure, but rather a marker of general pesticide stress in the bacterium *Pseudomonas fluorescens*.

Keywords : Pesticides ; qPCR ; ddPCR ; *tspo*, Biomarker ; *Pseudomonas fluorescens*

Introduction

Soil organisms and ecosystems close to farmland are the first to be affected by pesticide dispersal ([1,2]). The question of the impact of pesticides on non-target organisms is part of the core research of environmental toxicology and ecotoxicology. Routine approaches, based on the detection and quantification of pesticide residues and their metabolites in soil or water samples, provide an overview of the state of chemical contamination of the environment but do not supply information on the impact of these products on organisms. The development of omics sciences in the late 1990s led to the emergence of toxicogenomics (the use of omics approaches in toxicology). These methodologies make it possible to develop a biomarker approach of the contamination by providing an overview of the organism's response at different biological levels (genes, proteins, metabolites) exposed to stress ([3–5]).

Studying the impact of pesticides on ecosystems and their functioning is complex. It is why studies are led to extrapolate information by focusing on a particular group of organisms: ecosystem auxiliaries ("any organism participating in one or more key processes involved in the functioning of agrosystems and/or 'natural' ecosystems and in maintaining their biodiversity"). Soil bacteria and fungi are involved in biogeochemical cycles, organic matter recycling and/or beneficial interactions with plants ([6–12]). *Pseudomonas fluorescens* (γ -proteobacteria) is an example of a microbial ecosystem auxiliary in soils, as it participates in biogeochemical cycles and is classified as a *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ([13–16]).

A previous toxicogenomic study carried out in the laboratory showed that the transcriptomic profile of a model eukaryotic microorganism (*Paramecium tetraurelia*) could reveal markers indicating exposure to low doses (Effective Concentration 10% over the generation time, EC10) of pesticides (unpublished data). In this study, one gene showed strong over-expression compared with the control condition in the case of exposure to deltamethrin (an insecticide of the pyrethroid family): the *tspo* gene. Exposure to other pesticides (sulcotrione and tebuconazole) did not modify the expression of this gene. The TSPO (TranSlocator PrOtein) proteins family represent an ancient family of proteins (predicted to be present in LUCA core proteins (*Last Universal Common Ancestor*)) and are currently present in all three domains of life ([17,18]). This family is characterized by a very high structural conservation (five transmembrane domains linked to each other by loops) ([17,19,20]). However, the location and function of the protein are not conserved throughout evolution and vary according to the studied organism. In mammals, this protein is mitochondrial and participate in various cellular

processes, including steroidogenesis ([17,21–23]), whereas in plants it is associated with the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum, and participate essentially to the abiotic stress response ([24–28]). In bacteria, the membrane protein TSPO ([29–32]) harbors different functions including management of the heterotrophy-autotrophy transition in *Rhodobacter sphaeroides* ([33–36]), porphyrin metabolism in various bacteria ([19,37,38]) and management of nutritional stress in *Sinorhizobium meliloti* ([29]). Studies have been carried out to determine the role of this protein in *P. fluorescens* but there is currently no consensus on its function ([30–32]).

It has been assumed in this study that the *tspo* gene could be a genic biomarker of exposure to pyrethroid insecticides. This work set out (i) to show how the expression of the *tspo* gene was modified in the presence of low doses (EC10 over the generation time) of a wide range of pyrethroid insecticides using a quantitative PCR (qPCR) approach and (ii) to determine whether this modification of gene expression was specific to pyrethroids by measuring the level of *tspo* gene expression in presence of low doses (EC10) of various pesticides (other insecticides, herbicides, fungicides) using a droplet digital PCR (ddPCR) approach.

Materials and Methods

2.1. Bacterial strain, medium and chemicals.

The *Pseudomonas fluorescens* SG-1 strain used in this study was isolated from an agricultural soil and able to degrade sulfonylureas pesticides ([39]) was chosen as a bacterial edaphic auxiliary in this study. The bacterium was grown in low carbon GM medium (Growth Medium: 5 g/L proteose peptone, 1 g/L D-glucose, 2.5 g/L yeast extract, pH 7) at 28°C, in the dark with orbital shaking at 100 rpm.

The pesticides were : pyrethroid insecticides (pyrethrum, allethrin, bifenthrin, permethrin, λ -cyhalothrin, β -cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, PESTANAL, Sigma-Aldrich), neonicotinoid (imidacloprid, Honeywell, Fischer Scientific), organophosphate (chlorpyrifos, Honeywell, Fischer Scientific), glyphosate (PESTANAL, Sigma-Aldrich), sulfonylurea (nicosulfuron, PESTANAL, Sigma-Aldrich), triketone (sulcotrione, Honeywell, Fischer Scientific), Succinate Dehydrogenase Inhibitor (boscalid, Honeywell, Fischer Scientific) and triazole (tebuconazole, PESTANAL, Sigma-Aldrich). In most cases, these products were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich). Only glyphosate and nicosulfuron were dissolved in distilled water (due to low solubility in organic solvents).

2.2. Determination of the Effective Concentration 10% on the generation time for the various pesticides tested.

The EC10 on generation time corresponds to the concentration required to modulates by 10% the average generation time of a given bacterial population.

Table 1. EC10 on the generation time determined for *Pseudomonas fluorescens* SG-1 exposed to pesticides. *: approximative EC10s determined according to the curve profiles and/or OD corrections.

Pesticide group	Pesticide	EC10 (in mg/L)	Reference
Insecticides	Pyrethrum	13.5	This work
	Allethrin	3.5	This work
	Bifenthrin	4.5	This work
	Permethrin	0.5	This work
	λ -Cyhalothrin	15.5	This work
	β -Cyfluthrin	7.5	This work
	Cypermethrin	8	Hidalgo <i>et al.</i> , 2019
	Deltamethrin	8	Hidalgo <i>et al.</i> , 2019
	Fenvalerate	15.9	This work
	Imidacloprid	0.2	This work
	Chlorpyrifos	50*	This work
Herbicides	Glyphosate	50	This work
	Nicosulfuron	50*	This work
	Sulcotrione	382.5	Hidalgo <i>et al.</i> , 2019
Fungicides	Boscalid	5*	This work
	Tebuconazole	50*	This work

The EC10 was determined over a 90-minute exposure period, in GM medium under standard culture conditions (described in the section 2.1) for this bacterium. A starting inoculum (from an overnight preculture) was added in 30 mL of GM medium to achieve an Optical Density (OD, Ultrospec 10 Cell Density Meter, Amersham Biosciences) between 0.04 and 0.05 AU. Bacteria were exposed to increasing concentrations of pesticides (ranges used are presented in **Table S1**). The bacterial cultures were exposed to 150 μ L of pesticide solution to achieve the desired final concentrations in the medium (limited DMSO concentration at 0.5%).

The control condition was exposed to 0.5% DMSO. OD was monitored spectrophotometrically at 600 nm every 30 minutes during the experimental period. In cases where the pesticide caused a strong staining of the medium (chlorpyrifos and boscalid especially), the OD were corrected by placing tubes without bacteria under the same experimental conditions. The experiments were carried out in technical duplicates with six biological replicates.

The EC10 over the generation time was determined using the regression line of the curve representing the mean relative generation time as a function of the pesticide concentration. The EC10 values obtained here or selected in the literature are presented in **Table 1**.

2.3. Monitoring of *tspo* gene expression in *P. fluorescens* exposed to pesticides.

*2.3.1. Exposure of *P. fluorescens* to EC10.*

Starting inoculas were prepared as described in section 2.2. Bacteria were exposed to 150 μ L of pesticide solution to reach the determined EC10 value (0.5% DMSO maximum), the control condition was exposed to 0.5% DMSO. Two exposure times were defined: 90 min, considered as a short exposure time (characterizing the beginning of the exponential growth phase under the culture conditions used) and 300 minutes, considered as a long exposure time (middle of the exponential growth phase) because expression of the *tspo* gene is not continuous during the exponential growth phase ([32]). For each of the pesticide tested, eight biological replicates were carried out at each time point.

2.3.2. RNA extraction and reverse transcription.

After 90 min or 300 min of exposure, the bacteria were harvested by centrifugation (10,000 rpm for 10 minutes). Bacterial pellets were resuspended in 1 mL TRIzolTM (Invitrogen) and transferred to bead tubes (Bead Tubes Type B, Macherey-Nagel). Samples were immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C to limit RNA degradation. Samples were ground using FastPrep[®]-24 (6.0 m/S, 2 x 45 sec) (MP Biomedicals). Total RNAs were extracted using the NucleoSpin[®] RNA Set for NucleoZOL kit (Macherey-Nagel) according to the supplier's recommendations and stored at -80°C.

Reverse transcription was performed from 500 ng of total RNA using the iScriptTM cDNA Synthesis kit (BIO-RAD) according to the supplier's instructions using the ProFlex PCR System thermal cycler (applied biosystems). The synthesized cDNAs were stored at -20°C.

2.3.3. Quantitative PCR.

The characteristics of the primer pairs used are presented in **Table S2**. The qPCR reactions were performed in duplicate using the CFX96TM Real Time System thermal cycler (BIO-RAD). The reaction volume was set at 20 μ L: 10 μ L of Supermix (SsoAdvancedTM Universal SYBR[®] Green Supermix, BIO-RAD), 0.2 μ L of each primer (at 25 μ M), 2 μ L of template cDNA and 7.6 μ L of molecular grade water (Mediatech Inc). Following an initial denaturation for 5 min at 94°C, 40 cycles were performed with 1 min at 94°C for denaturation, 45 sec at 60°C for primer annealing, 1 min at 72°C for polymerase elongation and 5 min at 72°C for final polymerase elongation.

2.3.4. Droplet digital PCR.

Droplets were generated using Automated Droplet Generation Oil for EvaGreen[®] (BIO-RAD) *via* the QX200TM Automated Droplet Generator (BIO-RAD) with an average density of 20,000 droplets per sample. Amplification of the *tspo* gene was carried out with the same primer pair used for the qPCR approach. Amplification was performed from 100 ng of cDNA using the QX200TM ddPCRTM EvaGreen[®] Supermix kit (BIO-RAD) following the supplier's recommendations with the T100 Thermal Cycler (BIO-RAD). Results were obtained using the QX600TM Droplet Reader (BIO-RAD) and QX Manager Software Standard Edition (BIO-RAD).

2.3.5. Data analysis

Expression data for the *tspo* gene were normalized with expression data of a reference gene (*16S rDNA*) and analysed according to the scheme proposed by the Genomics Platform (Institute of research in immunology and cancer, University of Montreal, https://genomique.irc.ca/Infos_qPCR). The results of the *tspo* gene expression obtained by qPCR are presented in the form of Log₂(Fold change). Fold change is defined as the ratio of the expression of the targeted gene in a treated condition under the expression of the same gene in the control condition. The difference in expression between the control condition and the exposed condition is considered to be significantly different if Log₂(Fold Change) > 1 (twice overexpression compared to the control condition) or if Log₂(Fold Change) < -1 (underexpression by half compared to the control group).

The results of the *tspo* gene expression obtained by ddPCR are presented as the ratio of the number of the *tspo* transcript copies per 100 ng of cDNA in the exposed condition to the number of the *tspo* transcript copies per 100 ng of cDNA in the control condition. Based on the principles of qPCR data analysis, a ratio was considered to be significant when > 2

(overexpression compared with the control group, number of copies multiplied by two) or < 0.5 (underexpression compared with the control group, number of copies is divided by two).

Results

3.1. *tspo* gene expression in *P. fluorescens* exposed to a wide range of pyrethroid insecticides by qPCR.

3.1.1. Study after a short pesticide exposure period.

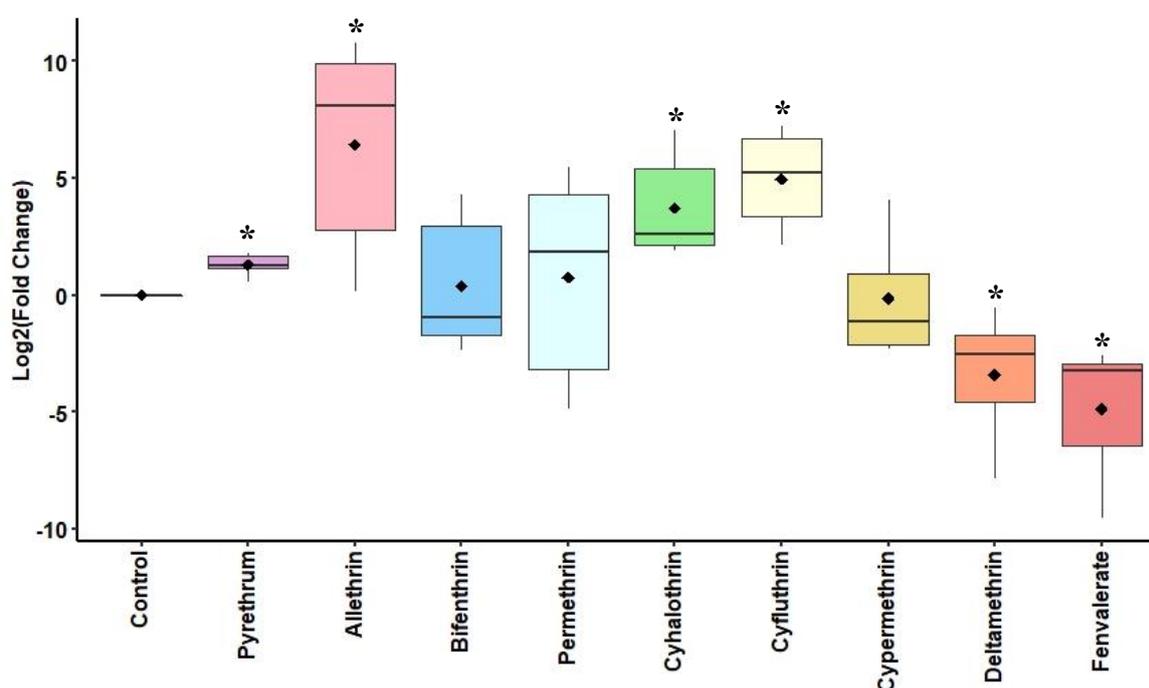


Figure 1. Log₂(Fold Change) of the *tspo* gene expression after 90 min exposure of *P. fluorescens* to EC10 for different pyrethroid insecticides. In each box, the horizontal line symbolizes the median and the black diamond the mean. Each box is made up of 6 to 8 Log₂(Fold Change) values. Significant difference in Log₂(Fold Change) compared to the control condition are represented by black asterisks (according to section 2.3.5.).

The Log₂(Fold Change) values of the *tspo* gene expression obtained in the case of the short exposure time of *P. fluorescens* to pyrethroids are presented in **Figure 1**. For the different pyrethroids, the following mean Log₂(Fold Change) values (\pm standard error) were obtained: 1.29 ± 0.18 for pyrethrum, 6.43 ± 1.91 for allethrin, 0.38 ± 1.23 for bifenthrin, 0.76 ± 1.86 for permethrin, 3.73 ± 0.94 for λ -cyhalothrin, 4.96 ± 0.87 for β -cyfluthrin, -0.14 ± 0.93 for cypermethrin, -3.40 ± 1 for deltamethrin and -4.88 ± 1.14 for fenvalerate. According to the criteria set, three cases can be highlighted: no difference in *tspo* gene expression following the insecticide exposure (bifenthrin, permethrin and cypermethrin), an over-expression of the gene

compared to the control group (pyrethrum, allethrin, λ -cyhalothrin and β -cyfluthrin) or an under-expression of the gene compared to the control condition (deltamethrin and fenvalerate). There was no common expression profile emerging after 90 min exposure to low doses of these different insecticides. The *tspo* gene was, on average, 11 and 29-fold less expressed in the presence of deltamethrin or fenvalerate than in the control condition whereas it was, on average, 13, 31 and 86-fold more highly expressed in the presence of λ -cyhalothrin, β -cyfluthrin or allethrin.

3.1.2. Study after a long pesticide exposure period

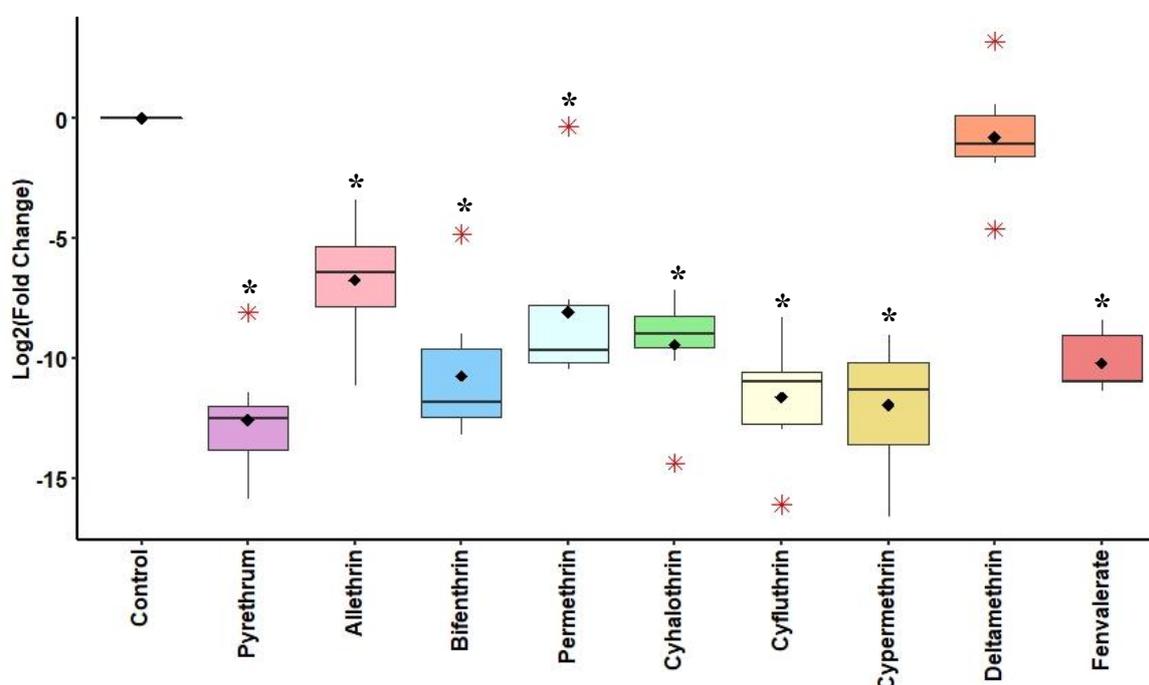


Figure 2. Log₂(Fold Change) of the *tspo* gene expression after 300 min exposure of *P. fluorescens* to EC10 for different pyrethroid insecticides. In each box, the horizontal line symbolizes the median and the black diamond the mean. Each box consists of 7 to 8 Log₂(Fold Change) values. Red asterisks represent outliers values. Significant difference in Log₂(Fold Change) compared to the control condition are represented by black asterisks (according to section 2.3.5.).

The Log₂(Fold Change) values of the *tspo* gene expression obtained in the case of the long exposure time of *P. fluorescens* to pyrethroids are presented in **Figure 2**. For the various pyrethroids, the following mean Log₂(Fold Change) values (\pm standard error) were obtained: -12.59 \pm 0.92 for pyrethrum, -6.74 \pm 0.82 for allethrin, -10.73 \pm 1. 0 for bifenthrin, -8.07 \pm 1.36 for permethrin, -9.42 \pm 0.78 for λ -cyhalothrin, -11.63 \pm 0.82 for β -cyfluthrin, -11.94 \pm 0.89 for

cypermethrin, -0.80 ± 0.79 for deltamethrin and -10.20 ± 0.56 for fenvalerate. Except exposure to deltamethrin, a 300 min exposure to EC10 of each pyrethroid induced a strong underexpression of the *tspo* gene in *P. fluorescens* ranging from 107 (allethrin) to 6165-fold less (pyrethrum).

3.2. *tspo* gene expression in *P. fluorescens* exposed to various pesticides by ddPCR.

3.2.1. *tspo* gene expression in *P. fluorescens* during growth.

Figure 3 shows the copy number of the *tspo* transcript per 100 ng of cDNA after 90 or 300 min of growth in the control condition. An average of 46.7 ± 3.49 copies of the *tspo* transcript were observed by ddPCR after 90 min of growth and reached an average of 855.7 ± 142.70 copies at 300 min of culture. We can therefore suppose that gene expression is not continuous during the exponential growth phase but increases as proposed by Leneveu-Jenvrin and colleagues (2015) ([32]).

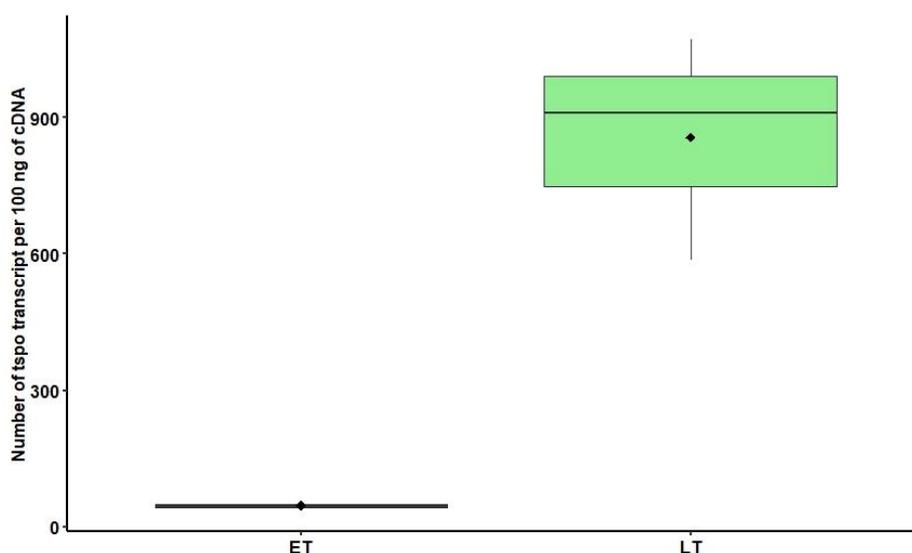


Figure 3. Copy number of transcripts of the *tspo* gene per 100 ng of cDNA during growth of *P. fluorescens*. In each box, the horizontal line symbolizes the median and the black diamond the mean. Each box is made up of triplicates. ET: short exposure period (90 min), LT: long exposure period (300 min).

3.2.2. Study after a short pesticide exposure period.

The ratios of the number of copies of the *tspo* transcript per 100 ng of cDNA obtained in the case of short exposure of *P. fluorescens* to pesticides are shown in **Figure 4**. For the different pesticides tested, the following mean ratios (\pm standard error) were obtained: 2.32 ± 0.26 for glyphosate, 1.41 ± 0.33 for nicosulfuron, 1.96 ± 0.26 for sulcotrione, 2.27 ± 0.12 for imidacloprid, 1.77 ± 0.05 for chlorpyrifos, 1.75 ± 0.23 for tebuconazole and 1.47 ± 0.59 for boscalid. According to the criteria set, only exposure to glyphosate and imidacloprid resulted

in a significant change in the expression of the *tspo* gene over a short period of time, even if, in a general way, the exposure of *P. fluorescens* to pesticides tends to an increase of the *tspo* transcript copy number compared to the control condition.

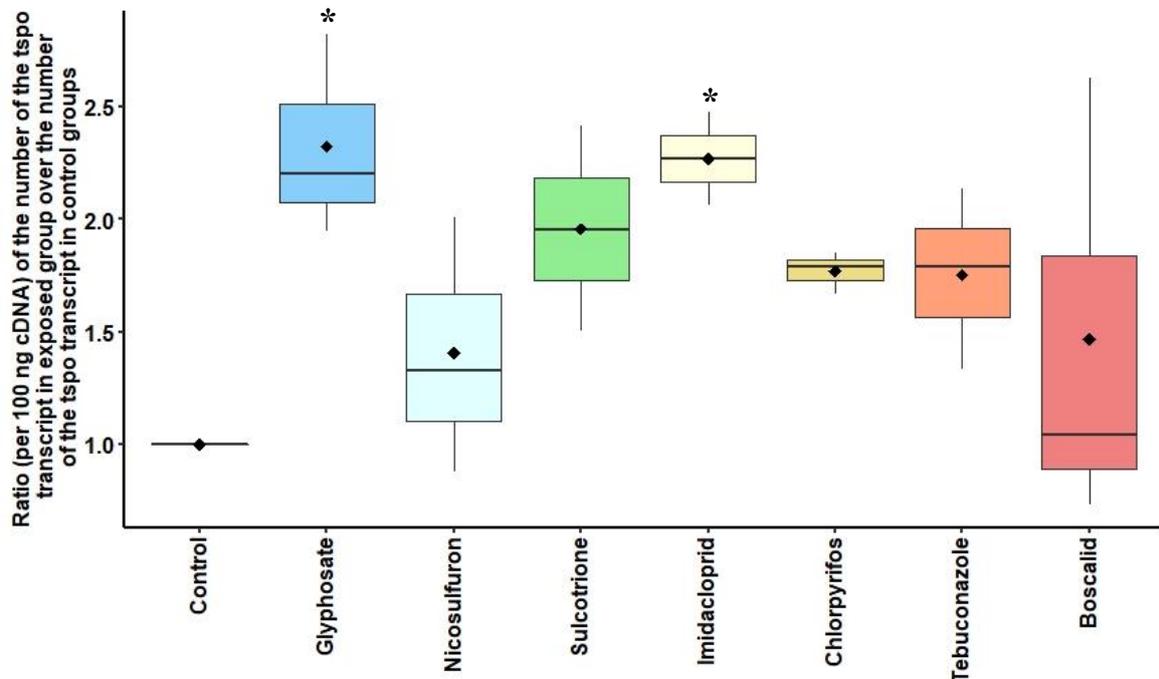


Figure 4. Effect of 90-minute exposure of *P. fluorescens* to EC10 for different pesticides on the copy number of the *tspo* transcript. In each box, the horizontal line symbolizes the median and the black diamond the mean. Each box is made up of triplicate. Significant difference in *tspo* transcript number compared to the control condition are represented by black asterisks (according to section 2.3.5.).

2.2.3. Study after a long pesticide exposure period.

The ratios of the number of copies of the *tspo* transcript per 100 ng of cDNA obtained in the case of long exposure of *P. fluorescens* to pesticides are shown in **Figure 5**. For the different pesticides tested, the following mean ratios (\pm standard error) were obtained: 0.12 ± 0.03 for glyphosate, 0.20 ± 0.06 for nicosulfuron, 0.06 ± 0.02 for sulcotrione, 0.10 ± 0.03 for imidacloprid, 0.08 ± 0.03 for chlorpyrifos, 0.23 ± 0.08 for tebuconazole and 0.08 ± 0.01 for boscalid. In the case of a 300 min exposure to the pesticide EC10, a sharp drop in the number of copies of the *tspo* transcript in *P. fluorescens* was observed compared to the control condition. The number of copies of the *tspo* gene was divided by 4 in the case of exposure to tebuconazole, by 5 in the case of exposure to nicosulfuron, by 8 in the case of exposure to glyphosate, by 10 in the case of exposure to imidacloprid, by 13 in the case of exposure to chlorpyrifos or boscalid and by 17 in the case of exposure to sulcotrione.

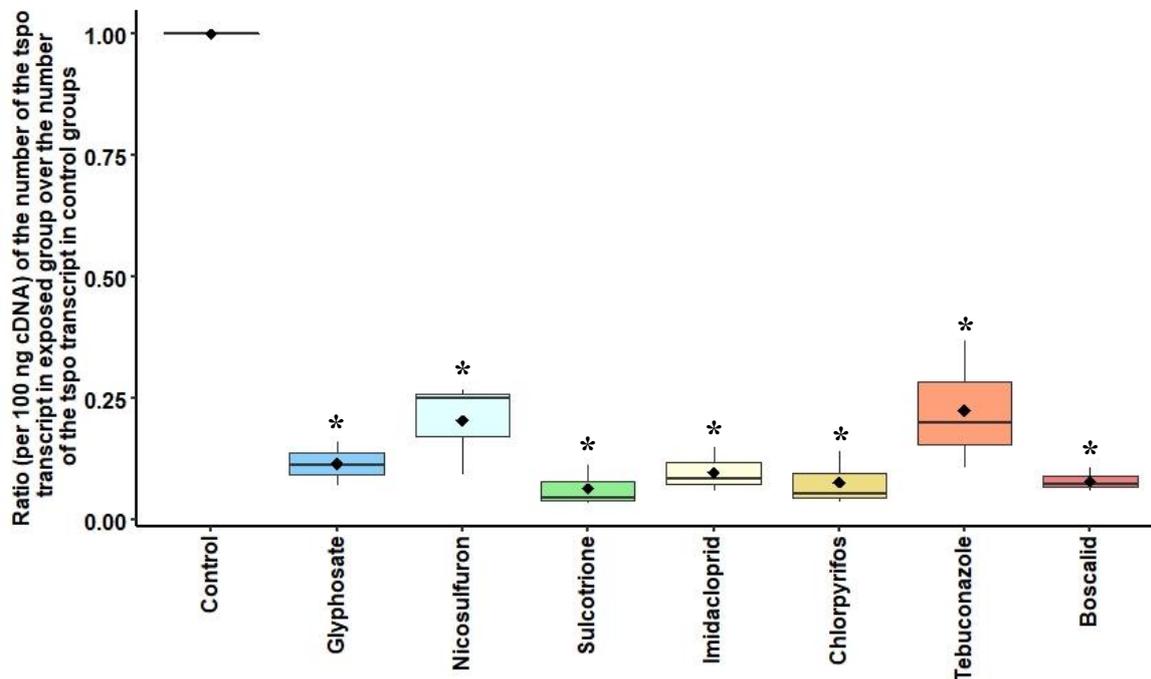


Figure 5. Effect of 300-minute exposure of *P. fluorescens* to EC10 for different pesticides on the copy number of the *tspo* transcript. In each box, the horizontal line symbolizes the median and the black diamond the mean. Each box is made up of triplicate. Significant difference in *tspo* transcript number compared to the control condition are represented by black asterisks (according to section 2.3.5.).

Discussion

4.1. Determination of the pesticides EC10 on the generation time of *P. fluorescens*.

In this study, the EC10 on the generation was chosen because it represented a laboratory low doses exposure. Determination of this concentration involves OD measurement at 600 nm. This method has many advantages, including easy implementation and well-described calculation approaches. However, this approach becomes very limited when a colored compound is introduced into the cultures (as in the case of chlorpyrifos and boscalid). This requires parallel measurements (on culture volumes without bacteria) to correct the OD values obtained in the case of exposure. These corrections are sometimes very strong due to the absorbance of the pesticide at 600 nm. The EC10 values determined are then mainly hypothetical and do not necessarily reflected a real EC10 on the generation time (illustrated by an asterisk in **Table 1**). In addition, a high degree of heterogeneity was observed in the determination of different EC10 values, depending on the biological replicates studied.

The pyrethroids can be classified in type I and type II based on their molecular structure (presence of an α -cyano group in type II pyrethroids) and the associated toxic syndrome on mammals (tremor syndrome for type I and choreoathetosis and salivation syndrome for type II) ([40]). The type I pyrethroids (allethrin, bifenthrin, permethrin) had a stronger effect on generation time of *P. fluorescens* than type II pyrethroids (λ -cyhalothrin, β -cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate). This is in contradiction to the literature which generally accepted that type II pyrethroids are more toxic to organisms than type I pyrethroids ([41,42]).

4.2. *tspo* gene expression in *P. fluorescens* exposed to pesticides.

According to studies based on structural and functional evolution, it is suggested the TSPO can be considered as a bio-regulatory protein functionally adapted to the organism, tissue or cell in which it is produced, whereas its original role was that of an environmental sensor. Despite functional studies from organisms representing various taxa of life, the precise function(s) of this protein remain unclear due to its involvement in many complex cellular processes. By the way, in every organisms studied, TSPO appears to be involved (at least partially) in sensing and responding to stress ([17,20]). Thus, it is suggested to act as a receptor, sensor, transporter or translocator, sensitive to a wide variety of ligands.

The *tspo* gene expression was not continuous during the exponential phase of growth of *P. fluorescens* [32], so it seems more interesting to focus on the middle or the end of the exponential growth phase when gene expression reaches a maximum in the bacterium.

The aim of this work was to evaluate the expression levels of the *tspo* gene when the bacterium was exposed to different pesticides stress, in order to decipher its function as possible biomarker of exposure to pyrethroid insecticides. No generalized expression profile was observed in the case of 90 min exposure to pyrethroids EC10. This means that the effect of the xenobiotic on *tspo* gene expression at this time scale seems to be essentially dependent on the pyrethroid molecule considered but not selective toward type I and/or type II pyrethroids. However, the qPCR approach revealed a general decrease in gene expression in the presence of EC10 of each pyrethroid insecticide when the exposure time is longer (300 min). Initial evidence suggests that the *tspo* gene could be a potential biomarker of exposure to pyrethroid insecticides in *P. fluorescens* (only deltamethrin does not seem to follow the same response pattern). The ddPCR approach revealed a generalized profile in the case of 90 min exposure to EC10 for the different pesticide tested. An increase of the *tspo* transcript copy number was observed compared to the control condition even if, only glyphosate and imidacloprid induced

a significant increase in *tspo* gene expression at this time scale. However, the ddPCR approach revealed a general decrease in gene expression in presence of EC10 of the various pesticides tested when the exposure time is longer (300 min). These observations of *tspo* gene expression are contrary to those observed in *P. tetraurelia* (unpublished data). Indeed, when the protist was exposed to deltamethrin EC10 during a long period of time (72h) the *tspo* gene was overexpressed. In addition, an exposure to sulcotrione or tebuconazole EC10 did not induce a modulation of *tspo* gene expression in *Paramecium* contrary to what was observed in *P. fluorescens*. Given our current state of knowledge, it is clear that the behavior of the *tspo* gene is modified when bacterial cells are subjected to different types of pesticides. In each case of pesticide exposure, there is a down expression (sometimes with a huge amplitude). At first sight, this indicates that *tspo* cannot be considered as a biomarker of pyrethroid-specific exposure, but rather as a marker of a general pesticide stress in the bacterium *Pseudomonas fluorescens*. This could reveal an adaptation strategy of the cell to chemical stress caused by a wide range of xenobiotics or, could testify to an alteration in the detoxication mechanisms needed to counteract the impact of these pesticides.

Although the data generated by the two approaches are not easily comparable (semi-quantitative data for qPCR and quantitative data for ddPCR), it can be assumed that the type of xenobiotic used is a driven characteristic on the decrease in *tspo* gene expression. Indeed, the decrease observed at 5-hours of exposure to pyrethroids EC10 is at least 107-fold, whereas it is at most 17-fold in the case of the other pesticides tested (sulcotrione). At this stage of our experimentation, it is hard to draw this kind of link between regulation of *tspo* expression and type of pesticide molecule. It is not known how pesticides interact with the bacterium. For pyrethroids insecticides, it has been reported in the literature that these insecticides are able to directly interact with the TSPO protein, although this has only been shown on rare occasions in mammals ([43–45]). Currently, it is not known whether this interaction is possible with microbial TSPOs, and whether there is a difference in affinity between prokaryotic and eukaryotic TSPO proteins for these compounds.

4.3. Outlooks.

Data generated in this study do not allow us to link pesticide concentration and the decrease in *tspo* gene expression. As a first step, it would be interesting to determine whether there is a dose-dependent relationship between pesticides concentrations and the expression of *tspo* gene. ddPCR investigations will facilitate acquisition of these data with weak technical

constraints, as it provides absolute gene expression quantification and discards technical replicates.

It would also be interesting to repeat this kind of experiment on other microorganisms in which the role of TSPO protein has been characterized (such as *Rhodobacter sphaeroides* or *Sinorhizobium meliloti*) ([29,33–36]). This would enable us to understand the effect of pesticides on cellular processes mediated by this family of proteins (autotrophy-heterotrophy transition, porphyrin metabolism, *ndi* locus functioning, ...). Studies carried out on TSPO in *P. fluorescens* have been limited to gene expression or *in silico* interactomics ([30–32]), making it possible to consider studies at the protein level. These could, for example, assess potential direct interactions between pesticides and TSPO proteins, or question the impact of abiotic stresses on the abundance and/or distribution of these proteins in the bacteria. Functional genomics studies can also be carried out to understand the function(s) of TSPO proteins in the *Pseudomonas* genus.

Author information

Corresponding author

Philippe Bouchard

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, UMR 6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, 63170 Aubière, France

Email: philippe.bouchard@uca.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Funding

This research was funded by the UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement.

References

1. Sánchez-Bayo F: **Chapter 4 Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems.** In *Ecological Impacts of Toxic Chemicals.* . 2011:63–87.
2. Schafer RB, van den Brink PJ, Liess M: **Chapter 6 Impacts of pesticides on freshwater ecosystems.** In *Ecological Impacts of Toxic Chemicals.* . 2011:111–137.
3. Hamadeh HK, Amin RP, Paules RS, Afshari CA: **An overview of toxicogenomics.** *Curr Issues Mol Biol* 2002, **4**:45–56.
4. Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH: **A Multibiomarker approach to environmental assessment.** *Environ Sci Technol* 2004, **38**:1723–1731.
5. Ankley GT, Daston GP, Degitz SJ, Denslow ND, Hoke RA, Kennedy SW, Miracle AL, Perkins EJ, Snape J, Tillitt DE, *et al.*: **Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology.** *Environ Sci Technol* 2006, **40**:4055–4065.
6. Barrios E: **Soil biota, ecosystem services and land productivity.** *Ecol Econ* 2007, **64**:269–285.
7. Madsen EL: **Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles.** *Curr Opin Biotechnol* 2011, **22**:456–464.
8. Miransari M: **Soil microbes and plant fertilization.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **92**:875–885.
9. Maier RM: **Chapter 16 Biogeochemical cycling.** In *Environmental Microbiology: Third Edition.* . Elsevier Inc.; 2015:339–373.
10. Toor MD, Adnan M: **Role of soil microbes in agriculture; A review.** *Biog Sci Res* 2020, **4**:1–5.
11. Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G: **Microbial diversity and soil functions.** *Eur J Soil Sci* 2003, **54**:655–670.
12. Wilpiseski RL, Aufrecht JA, Retterer ST, Sullivan MB, Graham DE, Pierce EM, Zablocki OD, Palumbo A V., Elias DA: **Soil aggregate microbial communities: towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales.** *Appl Environ Microbiol* 2019, **85**:1–18.
13. Walsh UF, Morrissey JP, O’Gara F: **Pseudomonas for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation.** *Curr Opin Biotechnol* 2001, **12**:289–295.

14. Raaijmakers JM, Vlami M, de Souza JT: **Antibiotic production by bacterial biocontrol agents.** *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 2002, **81**:537–547.
15. Couillerot O, Prigent-Combaret C, Caballero-Mellado J, Moënne-Loccoz Y: ***Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens.** *Lett Appl Microbiol* 2009, **48**:505–512.
16. Gera Hol WH, Martijn Bezemer T, Biere A: **Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*.** *Front Plant Sci* 2013, **4**:1–9.
17. Fan J, Lindemann P, G.J. Feuilloley M, Papadopoulos V: **Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa).** *Curr Mol Med* 2012, **12**:369–386.
18. Fan J, Papadopoulos V: **Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals.** *PLoS One* 2013, **8**:1–20.
19. Batoko H, Veljanovski V, Jurkiewicz P: **Enigmatic Translocator protein (TSPO) and cellular stress regulation.** *Trends Biochem Sci* 2015, **40**:497–503.
20. Li F, Liu J, Liu N, Kuhn LA, Garavito RM, Ferguson-Miller S: **Translocator protein 18 kDa (TSPO): An old protein with new functions?** *Biochemistry* 2016, **55**:2821–2831.
21. Anholt RRH, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH: **The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane.** *J Biol Chem* 1986, **261**:576–583.
22. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, *et al.*: **Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function.** *Trends Pharmacol Sci* 2006, **27**:402–409.
23. Papadopoulos V, Aghazadeh Y, Fan J, Campioli E, Zirkin B, Midzak A: **Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis.** *Mol Cell Endocrinol* 2015, **408**:90–98.
24. Guillaumot D, Guillon S, Déplanque T, Vanhee C, Gumy C, Masquelier D, Morsomme P, Batoko H: **The *Arabidopsis* TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmic reticulum-Golgi-localized membrane protein.** *Plant Journal Plant J* 2009, **60**:242–256.
25. Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H: **The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential**

- scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism.** *Plant Cell* 2011, **23**:785–805.
26. Vanhee C, Guillon S, Masquelier D, Degand H, Deleu M, Morsomme P, Batoko H: **A TSPO-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast.** *J Exp Bot* 2011, **62**:497–508.
27. Vanhee C, Batoko H: ***Arabidopsis* TSPO and porphyrins metabolism a transient signaling connection?** *Plant Signal Behav* 2011, **6**:1383–1385.
28. Hachez C, Veljanovski V, Reinhardt H, Guillaumot D, Vanhee C, Chaumont F, Batoko H: **The *Arabidopsis* abiotic stress-induced Tspo-related protein reduces cell-surface expression of the aquaporin PIP2;7 through protein-protein interactions and autophagic degradation.** *Plant Cell* 2014, **26**:4974–4990.
29. Davey ME, De Bruijn FJ: **A homologue of the tryptophan-rich sensory protein TspO and fixL regulate a novel nutrient deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* locus.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**:5353–5359.
30. Chapalain A, Chevalier S, Orange N, Murillo L, Papadopoulos V, Feuilloley MGJ: **Bacterial ortholog of mammalian translocator protein (TSPO) with virulence regulating activity.** *PLoS One* 2009, **4**.
31. Leneveu-Jenvrin C, Connil N, Bouffartigues E, Papadopoulos V, Feuilloley MGJ, Chevalier S: **Structure-to-function relationships of bacterial translocator protein (TSPO): A focus on *Pseudomonas*.** *Front Microbiol* 2014, **5**:1–12.
32. Leneveu-Jenvrin C, Bouffartigues E, Maillot O, Cornelis P, Feuilloley MGJ, Connil N, Chevalier S: **Expression of the translocator protein (TSPO) from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 requires the stress regulatory sigma factors AlgU and RpoH.** *Front Microbiol* 2015, **6**:1–13.
33. Yeliseev AA, Kaplan S: **A sensory transducer homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor regulates photosynthetic membrane complex formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.** *J Biol Chem* 1995, **270**:21167–21175.
34. Yeliseev AA, Kaplan S: **A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.** *J Biol Chem* 1999, **274**:21234–21243.
35. Yeliseev AA, Kaplan S: **TspO of *Rhodobacter sphaeroides*. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5657–5667.

36. Zeng X, Kaplan S: **TspO as a modulator of the repressor/antirepressor (PpsR/AppA) regulatory system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1.** *J Bacteriol* 2001, **183**:6355–6364.
37. Ginter C, Kiburu I, Boudker O: **Chemical catalysis by the translocator protein (18 kDa).** *Biochemistry* 2013, **52**:3609–3611.
38. Guo Y, Kalathur RC, Liu Q, Kloss B, Bruni R, Ginter C, Kloppmann E, Rost B, Hendrickson WA: **Structure and activity of tryptophan-rich TSPO translocator proteins.** *Science (80-)* 2015, **347**:551–555.
39. Carles L, Joly M, Bonnemoy F, Lereboure M, Batisson I, Besse-Hoggan P: **Identification of sulfonyleurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: Toxicity assessment and effect of formulation.** *J Hazard Mater* 2017, **324**:184–193.
40. Soderlund DM: **Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances.** *Arch Toxicol* 2012, **86**:165–181.
41. Elliott M: **The pyrethroids: Early discovery, recent advances and the future.** *Pestic Sci* 1989, **27**:337–351.
42. Tsuji R, Yamada N, Kawamura S: **Mammal toxicology of synthetic pyrethroids.** In *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*. . Topics in Current Chemistry; 2012.
43. Devaud LL, Szot P, Murray TF: **PK 11195 Antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity.** *Eur J Pharmacol* 1986, **120**:269–273.
44. Devaud LL, Murray TF: **Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides.** *J Pharmacol Exp Ther* 1988, **247**:14–22.
45. Guven C, Sevgiler Y, Taskin E: **Chapter 12: Pyrethroid insecticides as the mitochondrial dysfunction inducers.** In *Mitochondrial Diseases*. . 2018:293–322.
46. Pournaras S, Maniati M, Spanakis N, Ikonomidis A, Tassios PT, Tsakris A, Legakis NJ, Maniatis AN: **Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity.** *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**:761–764.

Supplementary material

Table S1. Concentrations ranges used for EC10 determination on generation time in *Pseudomonas fluorescens*.

Pesticide group	Pesticide	Ranges used
Insecticides	Pyrethroids	0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 25 mg/L
	Imidacloprid	0 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 ; 300 µg/L
	Chlorpyrifos	0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 mg/L
Herbicides	Glyphosate	0 ; 40 ; 100 ; 200 ; 350 ; 500 mg/L
	Nicosulfuron	0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 mg/L
	Sulcotrione	0 ; 100 ; 300 ; 500 ; 800 mg/L
Fungicides	Boscalid	0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 mg/L
	Tebuconazole	0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 mg/L

Table S2. Characteristics of the primers used to study the *tspo* gene expression by qPCR and ddPCR. Note that both primer pairs are used in qPCR, whereas only the *tspo*-specific pair is used in ddPCR.

Name	Sequence (5' → 3')	T _M (°C)	Amplicon size (pb)	Linearity (r ²) Efficiency (E)	Validate C _Q range	Reference
<i>tspo</i>	F-GTACGAATCCCTGGTCAAGC R-ACAGGGTGTTCACGCAATC	59	170	r ² = 0.98 E = 100%	24-33	This work
<i>16S rDNA</i>	F-GGAGCATGTGGTTTAATTCTGA R-TGCGGGACTTAACCCAACA	60	161	r ² = 0.99 E = 80.9%	12-29	[46]

III. Résultats marquants, discussion et conclusions :

La bactérie *P. fluorescens* a été soumise à des stress pesticides que l'on peut qualifier de faibles doses de laboratoire : Concentration Efficace 10% sur le temps de génération de la bactérie. Deux temps d'exposition aux pesticides ont été définis : un temps court correspondant à une exposition de 90 min (début de la phase exponentielle de croissance) et un temps long correspondant à une exposition de 300 min (milieu de la phase exponentielle de croissance).

Les résultats de l'approche par RT-qPCR montrent qu'il n'y a pas de profil d'expression commun se dégageant après une exposition de 90 min à de faibles doses de différents insecticides pyréthrinoïdes (la réponse est variable en fonction du pyréthrinoïde considéré). Ainsi, le gène *tspo* est, en moyenne, 11 fois et 29 fois moins exprimés en présence de deltaméthrine ou de fenvalérate, respectivement, que dans la condition contrôle. Il est, en moyenne, 13 fois, 31 fois et 86 fois plus exprimé en présence de λ -cyhalothrine, de β -cyfluthrine ou d'alléthrine, respectivement. En revanche (exception faite du cas de la deltaméthrine), une exposition de 300 min, à la CE₁₀ des différents pyréthrinoïdes, induit une forte sous-expression du gène *tspo* chez *P. fluorescens*. Cette diminution de l'expression du gène *tspo* par rapport à la condition contrôle est comprise entre 107 fois moins (alléthrine) et 6165 fois moins (pyréthre). Ces premiers éléments laissent à penser que le gène *tspo* serait un potentiel biomarqueur de l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes (seule la deltaméthrine ne semble pas suivre le même schéma de réponse).

L'approche de RT-ddPCR a révélé un profil généralisé (tendance à la surexpression) dans le cas d'une exposition de 90 min à la CE₁₀ pour les différents pesticides testés même si, seuls le glyphosate et l'imidaclopride ont induit une augmentation significative, mais plutôt faible (2 fois), du nombre de copies du transcrit à cette échelle de temps. Une baisse généralisée de l'expression du gène a clairement été mise en évidence dans le cas d'une exposition prolongée (300 min) à de faibles doses pour tous les pesticides testés.

L'objectif de ce travail était d'évaluer les niveaux d'expression du gène *tspo* soumis à différents pesticides afin de le caractériser comme éventuel biomarqueur d'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes. En l'état actuel de nos connaissances, il est évident que le comportement du gène *tspo* est modifié lorsque les cellules bactériennes sont soumises à différents types de pesticides. La modulation de l'expression du gène par les pesticides étudiés indique que *tspo* ne peut être considéré comme un biomarqueur d'exposition spécifique aux pyréthrinoïdes et que, au contraire, il est marqueur d'un stress pesticide généraliste chez la bactérie *P. fluorescens*. Cette modulation pourrait révéler une stratégie d'adaptation de la cellule

soumise à un stress provoqué par ces types de molécules ou, au contraire, témoigner d'une altération des mécanismes de défenses nécessaires pour contrer l'impact de ces pesticides.

Bien que les données générées par les deux approches ne soient pas directement comparables (données semi-quantitatives pour la qPCR et quantitatives pour la ddPCR) il semble que le type de pesticide utilisé ait une grande incidence sur la diminution de l'expression du gène *tspo*. En effet, la diminution observée dans le cas d'une exposition de 300 min à de faibles doses de pyréthriinoïdes est de 107 fois minimum alors qu'elle est au maximum de 17 fois dans le cas des autres pesticides testés.

*Chapitre n° 5 Discussion
générale, conclusions et
perspectives*

Si les méthodes de chimie analytique deviennent de plus en plus sensibles pour détecter les micropolluants à l'état de traces dans les milieux ou les organismes, mesurer un état de contamination des milieux ne permet pas de prédire les effets des xénobiotiques sur les organismes peuplant ces milieux. Un changement majeur s'est opéré suite aux évolutions technologiques qui ont accompagné le développement des approches de biologie haut-débit. Leurs mises en œuvre dans un contexte (éco)toxicologique a permis le développement d'une nouvelle discipline appelée (éco)toxicogénomique. Elles permettent d'étudier la réponse complète d'un organisme lorsqu'il est soumis à un stress (chimique notamment) et d'accéder à de (très) nombreux biomarqueurs (potentiels) de la toxicité. Mes travaux de recherche sont associés à ce vaste contexte et ont eu pour objectif de :

- Confirmer la pertinence de l'approche volatolomique dans un contexte de toxicologie environnementale
- Mettre en évidence de potentiels biomarqueurs volatiles témoignant d'une exposition au fipronil chez l'abeille *Apis mellifera*
- Valoriser les composés issus de la signature volatile obtenue chez l'abeille
- Déterminer le potentiel d'un biomarqueur génique, le gène *tspo*, comme marqueur spécifique d'une exposition aux insecticides pyréthrinoïdes chez la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens*.

I. La volatolomique, une approche pertinente en toxicogénomique ?

A. La volatolomique et la mise en évidence de biomarqueurs potentiels :

L'approche volatolomique développée chez l'abeille domestique a permis de montrer qu'il existait une déviation du volatolome consécutive à une exposition chronique de 21 jours à de faibles doses de fipronil. Cette déviation étant essentiellement constituée de composés ayant une activité sémiochimique, il est possible de conclure, qu'à ces doses (et en condition chronique par voie trophique), le fipronil induit une modification de la communication intraspécifique médiée par les composés volatils. Cette approche méthodologique a donc mis en évidence une signature volatile comprenant 14 composés (seuls 11 ont pu être identifiés). Il est cependant impossible d'affirmer si la signature volatile mise en évidence ici peut être définie comme un biomarqueur pertinent de l'exposition au fipronil chez *A. mellifera*. La caractérisation d'un biomarqueur doit prendre en compte plusieurs paramètres : il faut dans l'idéal être capable de faire le lien entre les effets de l'exposition et la présence d'un

xénobiotique (à l'échelle de l'individu voire de la population ou de l'écosystème) et entre le biomarqueur et la *fitness* global de l'organisme. Il faut prendre en compte la notion de temporalité (un marqueur précoce et/ou transitoire n'a que peu d'utilité en pratique) et la notion de dose/concentration d'exposition (un biomarqueur d'exposition aiguë est en pratique moins pertinent qu'un biomarqueur d'exposition chronique car dans l'environnement les organismes sont soumis de manière chronique à de faibles doses de xénobiotiques). Il faut également tenir compte de la variabilité du biomarqueur, elle peut venir de facteurs biotiques (plasticité phénotypique, âge, génotype, ...) ou de facteur abiotique (température, pH, salinité, concentration en oxygène, ...). Il existe donc un variabilité spatio-temporelle intrinsèque à chaque biomarqueur qui doit être la plus faible possible pour pouvoir imaginer une utilisation en évaluation du risque environnemental. Il faut également prendre en compte la notion financière pour juger le potentiel d'un biomarqueur : un bon biomarqueur est un biomarqueur peu coûteux que ce soit en termes de consommables, d'appareillages ou de personnel (Eason and O'Halloran, 2002; Handy *et al.*, 2003; Forbes *et al.*, 2006). La validation d'un biomarqueur est donc un processus long et coûteux. C'est pourquoi, dans le cadre de ma thèse, je me suis attaché à considérer le développement de nouvelles preuves de concepts pour mettre en évidence des biomarqueurs potentiels, qui devront être validés dans un second temps. Au cours de mon étude, la signature volatile détectée chez l'abeille exposée au fipronil a été analysée après 14 et 21 jours d'exposition chronique afin, d'une part, de pouvoir suivre l'accumulation des composés volatils dans les tissus de l'abeille, et d'autre part, de rechercher une signature témoignant de l'exposition chronique au fipronil. Cependant, des points de mesure supplémentaires, notamment sur des temps d'exposition plus court (après 24 ou 48h d'exposition par exemple), devront être réalisés afin de confirmer ces premières données encourageantes dans l'optique de suivre plus en détail l'accumulation des composés sémiochimiques et de rechercher une signature témoignant de la réorganisation du métabolisme. L'approche développée ici a été réalisée en laboratoire dans des conditions contrôlées, il est donc impossible de déterminer si ces composés marqueurs de l'exposition seront toujours détectables dans une ruche. Il serait également nécessaire de développer des approches en conditions semi-contrôlées (dans des tunnels) sur des ruches entières pour confirmer la signature volatile détectée *in vitro* mais également pour introduire une notion d'étude comportementale permettant de valider l'hypothèse de perturbations de la communication intraspécifique chez l'abeille (agressivité, temps de vol, orientation, « activité de butinage »).

Il a été démontré à de nombreuses reprises et dans divers domaines scientifiques (médecine, agroalimentaire et écotoxicologie dans une moindre mesure) que l'approche volatolomique était une approche pertinente pour la recherche et la mise en évidence de biomarqueurs potentiels (Peng *et al.*, 2010; Broza and Haick, 2013; Ratel *et al.*, 2017, 2022; Hidalgo *et al.*, 2019).

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans cette dynamique de démonstration pour confirmer que la volatolomique trouve bien sa place au côté des autres sciences « omiques » pour la recherche de biomarqueurs en toxicologie environnementale et en écotoxicologie. De façon complémentaire avec la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique, la volatolomique permet de mesurer la réponse induite par un stressor chimique à différents niveaux d'organisation biologique. Il faut garder à l'esprit que l'approche développée ici a été réalisée sous la forme d'une méthode « omique » isolée. Aussi, il serait intéressant de la combiner à d'autres approches « omiques » pour avoir une vision intégrée des différents niveaux de réponse, de la perception du stimulus jusqu'à la réponse de l'organisme. Et donc, *in fine*, de pouvoir mieux apprécier son état physiologique dans le cas d'une exposition à un xénobiotique.

B. Les « limites » de la volatolomique ... en (éco)toxicologie :

La volatolomique est souvent, et à tort, considérée comme l'étude des composés de bout de chaîne métabolique. Dans le cas du volatolome de l'abeille, nous avons pu montrer que la technique est suffisamment sensible pour reconstruire une partie de la voie métabolique qui a lieu dans la glande de Nasonov en se basant sur des composés discriminants isolés. Ainsi, nous avons mis en évidence des molécules ayant une activité sémi chimique (acide nérolique, acide géranique et farnésol) mais également des intermédiaires de leurs anabolisme ou catabolisme (géranyle acétone et 6-méthyl-5-heptène-2-one). Les isomères du citral, composés essentiels dans cette voie métabolique, ont également été détectés par cette approche mais ont été rejetés pour un défaut de normalité. La volatolomique semble être une alternative intéressante en termes d'échantillonnage environnemental puisque cinq abeilles sont suffisantes pour former un échantillon. Il est donc possible de développer des études de suivis sur des ruches entières en utilisant un nombre réduit d'organismes. Bien que les tissus analysés dans cette étude soient très pauvres en cellules nerveuses (chaîne ganglionnaire abdominale), cette étude a pourtant permis de mettre en évidence un composé ayant une activité neurotropic pouvant interférer avec les effets induits par le fipronil lors de la transmission de l'influx nerveux. Il serait donc

nécessaire de réitérer le suivi volatolomique, non plus dans l'abdomen mais, dans la tête des abeilles pour caractériser les effets de l'insecticide dans ce tissu riche en sites cibles. La piste d'une modulation de l'effet des insecticides neurotoxiques sur différents récepteurs neuronaux est particulièrement ouverte dans ce travail. Il serait intéressant de réitérer cette expérience avec d'autres insecticides neurotoxiques pour challenger la volatolomique dans sa capacité à suivre de nouvelles molécules naturellement produites par l'abeille permettant de contrebalancer les effets de ces xénobiotiques.

Il faut cependant prendre en compte le manque de données générées par cette approche dans l'étude de l'impact (éco)toxicologique des pesticides puisque seuls quatre modèles ont été jusqu'alors utilisés (*Pseudomonas fluorescens* SG-1, *Bacillus megaterium* Mes-11, bactéries du microbiote intestinal humain et *Apis mellifera*) pour un nombre réduit de pesticides (deltaméthrine, cyperméthrine, sulcotrione, fipronil, tébuconazole) (Defois *et al.*, 2017; Defois *et al.*, 2018; Hidalgo *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2023; Hidalgo *et al.*, in prep). Il serait donc nécessaire de développer de nouvelles études volatolomiques pour générer une banque de données suffisante permettant de juger de la réelle pertinence de cette approche que ce soit en diversifiant les modèles utilisés ou les pesticides testés. L'approche volatolomique n'est pas une approche discriminante dans tous les cas de figure comme montré par Hidalgo et collaborateurs (Hidalgo *et al.*, 2019) dans le cas d'une exposition à la sulcotrione chez *B. megaterium*. Chez cette bactérie, l'herbicide ne semble avoir aucun effet toxique visible (la CE10 sur le temps de génération était de 327 mg/L) n'induisant pas de déviation du volatolome. *B. megaterium* est connue pour être une bactérie capable de s'encapsuler en cas de stress, limitant ainsi l'impact du xénobiotique sur l'organisme. La mise en place d'une structure de résistance pourrait être associée à l'absence d'effet observé. Une étude réalisée au cours de ma thèse (données non-présentées dans le manuscrit) s'est intéressée au développement de cette approche « omique » sur un modèle microbien eucaryote, *Paramecium tetraurelia*, exposé à de faibles doses de deltaméthrine et de cyperméthrine mais elle n'a pas été fructueuse, probablement en raison de la complexité du milieu de culture et de la structure cellulaire de l'organisme. La paramécie se présente sous la forme d'une cellule recouverte de cils (modèle présentant une grande surface d'échange avec le milieu) et se cultive dans un milieu contenant de nombreux composés (volatils) d'origine végétale (infusion d'herbe). Malgré les différents lavages réalisés lors de la récolte des cellules, il semble que des composés provenant du milieu de culture restent adhérents aux cils ou bloqués entre les cils. La fibre SPME utilisée pour extraire les COV étant caractérisée par une surface d'absorption limitée, elle a rapidement été saturée par les composés

provenant du milieu (probablement majoritaires et de plus grande taille créant un encombrement stérique plus important), empêchant ainsi de discriminer les différentes conditions expérimentales testées sur la base de leur profil volatil. Lors du développement de l'approche volatolomique sur un nouvel organisme modèle, il est nécessaire de connaître la biologie fondamentale de l'organisme (structure cellulaire, physiologie, méthode culturale, ...) pour entrevoir les pistes d'optimisation nécessaires à la réalisation de l'expérience.

II. Valorisation de potentiels biomarqueurs volatils issus d'une étude toxicogénomique :

A. Bilan sur l'effet bénéfique potentiel du 1-octen-3-ol sur la survie de l'abeille :

L'étude précédente a permis la mise en évidence d'un composé ayant une activité neurotropicque, le 2,6-diméthylcyclohexanol. Ce composé est décrit dans la littérature comme un modulateur des GABA-R pouvant être utilisé en médecine humaine et animale dans le domaine de l'anesthésiologie (Hall *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2016). Un autre COV (le 1-octen-3-ol) retrouvé dans le volatolome de l'abeille (classé parmi les composés non-discriminants de la première étude pour un défaut de normalité) est également décrit comme une molécule modulant l'activité des GABA-R (Hossain *et al.*, 2003; Johnston, 2006; Köksal, 2015). Ces deux COV sont des agonistes des GABA-R, à la différence du fipronil qui en est un antagoniste. L'effet bénéfique potentiel de ces deux composés neurotropes (produits par l'abeille) a été testé en condition de laboratoire après exposition chronique des abeilles à de faibles doses de fipronil. L'étude toxicologique a montré une faible toxicité de ces deux molécules en se basant sur le critère de survie de l'organisme après une exposition chronique par voie trophique. Une altération du comportement alimentaire (*a priori* sans conséquences majeures sur la biologie de l'organisme) a pu être mise en évidence dans le cas d'une exposition chronique au 2,6-diméthylcyclohexanol. Le 1-octen-3-ol a donc été sélectionné pour poursuivre les expérimentations. Les travaux menés dans le cas de la co-exposition fipronil/1-octen-3-ol ont montré qu'il existe un effet bénéfique du COV sur la survie des abeilles, qui a été améliorée sur la période expérimentale, même si les abeilles utilisées présentaient une grande sensibilité (possiblement en lien avec le statut sanitaire des abeilles). Ces résultats doivent donc être confirmés avec un nouveau groupe d'abeille moins sensibles ce qui permettra de vérifier la

reproductibilité (robustesse de l'étude) de l'approche sur ce modèle (éco)toxicologique dont la reproductibilité des résultats est toujours un challenge (Pisa *et al.*, 2015).

B. Les limites des descripteurs moléculaires analysés par qPCR :

Dans ce travail, une étude de l'expression de gènes marqueurs de processus cellulaires (en lien avec l'exposition au fipronil) a également été réalisée dans les têtes d'abeilles pour tenter de trouver une signature d'expression témoignant de l'effet du 1-octen-3-ol. Ces gènes ont été sélectionnés selon leurs implications dans les processus de gestion du stress oxydatif, le métabolisme des xénobiotiques et du GABA. De très faibles modifications dans l'expression de ces gènes ont pu être observées dans le cadre de ces travaux, indiquant qu'ils ne semblent pas être directement impliqués dans les processus mis en œuvre dans les différentes conditions expérimentales. L'expression des gènes impliqués dans la gestion du stress oxydant (catalase 2 et superoxyde dismutase 2) indique des conditions de stress oxydant au cours du temps, comme il a été à de nombreuses fois démontrés (Carvalho *et al.*, 2013; Roat *et al.*, 2013, 2017). Malgré tout, ces différences sont minimales et suggèrent un stress oxydatif limité dans ce tissu ou un stress géré efficacement par un pool d'enzymes déjà présentes. On note aussi une légère modulation du gène codant la glutathion-S-transférase S1 après 7 jours d'exposition chronique, suggérant la mise en place d'une voie de détoxification tardive et transitoire dans les têtes d'abeilles. Chez l'abeille, les processus de détoxification ont surtout été étudiés dans l'abdomen dans lequel se trouve la majorité du corps gras qui abrite les processus liés au métabolisme des xénobiotiques. Il est donc supposé que ce processus soit peu intense dans la tête. Bien que *A. mellifera* soit considérée comme un des insectes comptant le moins de gènes en lien avec le métabolisme des xénobiotiques (Berenbaum and Johnson, 2015; Gong and Diao, 2017), il serait intéressant de déterminer s'il existe une voie moléculaire préférentielle de métabolisation du fipronil, qui ne serait pas médiée par la GST-S1, dans les têtes d'abeille (carboxylestérase, cytochrome P₄₅₀ monooxygénase pour la phase I et transaminase et sulfato-transférase pour la phase II par exemple). Le métabolisme du GABA est très peu détaillé chez l'abeille. En se basant sur les voies métaboliques connues (humaine notamment), nous avons identifié deux enzymes clé respectivement impliquées dans l'anabolisme et le catabolisme du GABA : la glutamate décarboxylase et la GABA aminotransférase. Les gènes codant ces enzymes ont été identifiés dans le génome de *A. mellifera* permettant la création de couples d'amorces spécifiques pour ces gènes. Nous supposons que le fipronil pourrait modifier l'anabolisme alors que le 1-octen-3-ol influencerait le catabolisme du GABA. Aucune différence n'a été observé

dans l'expression de ces deux gènes quelques soit les conditions expérimentales. Chez les plantes, le métabolisme du GABA est bien décrit et est présenté comme un processus très finement régulé avec un niveau d'expression faible mais un pool d'enzymes intracellulaires persistant dans le temps (Bouché and Fromm, 2004; Li *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2023). Il est possible d'envisager un système régulé de la même façon chez l'abeille, ce qui pourrait expliquer l'absence de modulation d'expression de ces gènes. Les différents gènes utilisés ici n'ont pas été choisis au hasard mais sont issus (à l'exception de ceux liés au GABA) d'études sur le stress (biotique ou abiotique) dans l'abdomen des abeilles. Il existe donc des listes de gènes (mis en évidence par des approches de transcriptomique) pouvant être utilisés pour développer des études dans l'abdomen mais il n'existe pas de sets de gènes équivalents pour la tête (à titre d'exemple, Aufauvre *et al.*, 2014). Il serait intéressant de développer l'analyse transcriptomique en conditions de stress (pesticide notamment) dans la tête pour détecter des gènes d'intérêt. Ceux-ci pourraient par la suite être réutilisés pour des expériences de suivi en condition de stress par des approches de biologie moléculaires plus classiques. Il est donc nécessaire de développer des marqueurs moléculaires (descripteurs) pertinents dans ce tissu pour pouvoir évaluer et suivre le stress induit par le fipronil mais également suivre l'effet induit par l'addition du COV dans les cas de co-exposition.

C. D'autres pistes de valorisation pour les COV neurotropes :

Il existe d'autres pesticides agissant sur les GABA-R, notamment ceux de la famille des avermectines (ivermectine, abamectine). Il serait intéressant de déterminer si l'effet positif observé dans le cas d'une co-exposition 1-octen-3-ol/fipronil pourrait être maintenu indiquant ainsi un mécanisme adaptatif généraliste mis en place par les abeilles pour lutter contre ce type de molécules. Il faudrait également reconduire cette expérience en utilisant le 2,6-diméthylcyclohexanol pour tester son potentiel effet bénéfique en tenant compte de la modification de la prise alimentaire suite à l'exposition à cette molécule. Dans cette étude, le 1-octen-3-ol a été considéré comme un composé au potentiel « thérapeutique » puisque l'exposition à cette molécule a été réalisée en même temps que celle du stressor. Il semble opportun désormais de tester le potentiel « prophylactique » de cette molécule en réalisant des expositions différées dans le temps (exposition au COV dans un premier temps, puis exposition à l'insecticide).

La finalité de ces travaux de recherche conduit à deux grands types de perspectives, le premier est entièrement lié à des questions de recherche fondamentale et descriptive sur le long terme alors que le second est axé sur des questions d'utilisation en apiculture sur le court terme. Il est essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques mis en œuvre dans le cas de l'exposition au 1-octen-3-ol, au fipronil ou d'une co-exposition. Pour cela, il est possible de développer une approche permettant de déterminer les paramètres toxicocinétiques (absorption, distribution, métabolisation, excrétion) dans ces différentes situations en utilisant des composés marqués au carbone 13. Une étude sur le lien entre GABA-R d'abeille et 1-octen-3-ol doit être menée pour confirmer la liaison du COV (à mettre en lien avec un potentiel effet direct ou hormétique) sur le récepteur et confirmer son rôle de modulateur en passant par des approches de culture cellulaire et d'électrophysiologie. Ces approches permettraient également de déterminer s'il existe une réelle compétition pour les GABA-R entre l'insecticide et le COV. Outre ces questions fondamentales, une approche en conditions semi-contrôlées devra être développée pour, d'une part, vérifier si cet effet bénéfique du 1-octen-3-ol est toujours perceptible à l'échelle de la ruche (et vérifier si l'exposition au COV ou la co-exposition n'entraîne pas d'altération comportementale chez l'abeille) et, d'autre part, valider l'utilisation potentielle de ce composé en apiculture (notamment sous la forme d'un complément alimentaire).

III. Le gène *tspo* : un marqueur génique du stress pyréthrinoïde chez *P. fluorescens* ?

A. Les prémices de la sélection du marqueur *tspo* ... vers un changement d'organisme modèle :

L'approche toxicogénomique par transcriptomique (ADN microarray) développée chez la paramécie dans le cadre d'une exposition à de faibles doses de pesticides a montré qu'il était possible de dégager une signature d'expression propre au stress engendré aux différents pesticides testés (données non-publiées). L'exposition à la sulcotrione (378 mg/L) a engendré une modification de l'expression de gènes en lien avec la reproduction et le développement de l'organisme suggérant un effet reprotoxique de cet herbicide chez *Paramecium*. L'exposition à la deltaméthrine (2 µg/L), quant à elle, conduit à une réponse toxique généraliste avec une modulation de l'expression de gènes en lien avec la réponse au stress et le métabolisme énergétique. Un gène présente une importante sur-expression en présence de deltaméthrine : le

gène *tspo*. Ce gène, jusqu'alors non caractérisé chez les Protistes, a été annoté au laboratoire (données non-publiées) et a été identifiée *in silico* chez une dizaine de protistes (dont *Tetrahymena thermophila*, *Emiliana huxleyi*, *Giardia intestinalis* ou encore *Naegleria gruberi*) par des approches bioinformatiques basées sur l'analyse des clusters hydrophobes (peu de conservation de séquence mais une grande conservation topologique). Ainsi, la famille des gènes *tspo* est universellement répandue dans tous les taxons du vivant puisque désormais retrouvé chez les biconques unicellulaires où sa caractérisation était manquante. Dans la littérature, la protéine codée par ce gène est associée au récepteur périphérique aux benzodiazépines chez les mammifères. Chez ces organismes, un empoisonnement aigu aux insecticides pyréthrinoïdes peut être associé à un traitement aux benzodiazépines (Casida *et al.*, 1983; Bradbury and Coats, 1989; Ray and Forshaw, 2000; Bradberry *et al.*, 2005; Ramchandra *et al.*, 2019). L'hypothèse du gène *tspo* comme marqueur pertinent de l'exposition à cette famille d'insecticides neurotoxiques est née de ces travaux. Le modèle *Paramecium* présente de nombreux avantages (modèle de biologie cellulaire eucaryote, possibilité d'obtenir des lignées clonales homozygotes, existence d'une base de données spécialisée, grande surface d'échange avec le milieu, présent dans les premiers maillons des réseaux trophiques aquatiques, peut être qualifié d'auxiliaire des écosystèmes *via* son rôle dans la régulation des populations bactériennes) mais c'est un modèle dont la culture (bien que maîtrisée) est lourde et pour lequel le développement expérimental est complexe et chronophage (comptage manuel, méthodes de biologie moléculaire actuelles non-optimisées pour cet organisme, temps de culture relativement long). Nous avons donc choisi de poursuivre l'étude du gène *tspo* sur un modèle plus simple à utiliser, la bactérie du sol *Pseudomonas fluorescens*.

B. La CE10 chez *P. fluorescens*, quelques limites :

L'étude réalisée chez *P. fluorescens* a été initialement basée sur la détermination de faibles doses de laboratoire : la Concentration Efficace 10% (CE10) sur le temps de génération. Ces concentrations d'exposition ont été déterminées par une approche empirique basée sur la mesure de la densité optique à 600 nm au cours de la croissance bactérienne. C'est une méthode simple dont les approches calculatoires sont très bien décrites. Cependant, elle devient limitée lorsque le composé ajouté dans les cultures bactériennes absorbe aussi à 600 nm nécessitant alors le développement d'analyses parallèles sans bactéries permettant la correction (parfois très importantes) des valeurs de DO *a posteriori*. De plus, une grande hétérogénéité a été observée entre les différents réplicats biologiques. Cela suggère qu'il serait pertinent de changer

de paramètre mesuré pour déterminer des CE10 d'une plus grande précision en se basant par exemple, sur la mesure du taux respiratoire (évaluation de la concentration en dioxyde de carbone produit) ou l'activité de certaines enzymes impliquées dans des processus cellulaires clés (déshydrogénase, catalase, glucosidase, phosphatase, uréase, ...).

C. Bilan sur l'expression du gène *tspo* chez *P. fluorescens* exposé à différents pesticides :

L'exposition de *P. fluorescens* à de faibles doses d'insecticides pyréthrinoïdes entraîne une diminution généralisée de l'expression du gène *tspo* chez la bactérie lorsque le temps d'exposition est suffisamment long (300 min). L'approche de RT-qPCR conforte les résultats obtenus chez *Paramecium*, bien que la variation d'expression chez la bactérie soit totalement opposée à celle observée chez le protiste. L'approche de RT-ddPCR montre également une baisse généralisée de l'expression du gène cible lorsque la bactérie est exposée (300 min) à d'autres pesticides (hors pyréthrinoïdes) signifiant alors que le gène *tspo* est un potentiel biomarqueur généraliste du stress pesticide chez la bactérie et non un marqueur spécifique de l'exposition aux insecticides pyréthrinoïdes. Les données issues de ces deux approches de quantification par biologie moléculaire ne sont pas facilement comparables à cause de leur nature : données semi-quantitatives (relatives) pour la RT-qPCR et quantitatives (absolues) pour la RT-ddPCR. Cependant, il est possible d'affirmer (en se basant sur les composés testés) que le type de xénobiotique utilisé a une grande incidence sur l'amplitude de la diminution d'expression observée. En effet, elle est caractérisée par une diminution maximale de 17 fois (sulcotrione) dans le cas des pesticides testés hors pyréthrinoïdes alors qu'elle est au minimum de 107 fois (alléthrine) pour les pyréthrinoïdes.

Des études sur l'évolution structurelle et fonctionnelle de TSPO permettent de supposer que TSPO est devenue une protéine de bio-régulation fonctionnellement adaptée à l'organisme, au tissu ou à la cellule dans lequel elle se trouve alors qu'à l'origine la protéine avait probablement un rôle de senseur environnemental. Malgré les études réalisées dans tous les domaines du vivant, on ne peut pas clairement définir la (les) fonction(s) précise(s) de cette protéine du fait de son implication dans de nombreux processus cellulaires complexes. Mais elle pourrait agir comme un récepteur, un détecteur, un transporteur ou un translocateur sensible à une grande diversité de ligands. Chez tous les organismes étudiés, TSPO semble impliquée (au moins partiellement) dans la détection et la réponse au stress (Fan *et al.*, 2012; Li *et al.*,

2016). Cette modulation de l'expression du gène *tspo* pourrait révéler une stratégie d'adaptation de la cellule lorsqu'elle est soumise à un stress pesticide ou, au contraire, témoigner d'une altération des mécanismes de défenses nécessaires pour contrer le (ou les) effet(s) de ces composés.

D. Les limites de l'approche ddPCR :

La ddPCR ou *droplet digital PCR* est une approche de biologie moléculaire permettant de quantifier directement le nombre de copie d'une matrice ADN dans un échantillon donné. Cette méthode est basée sur le partitionnement du mélange réactionnel en milliers de gouttelettes (20 000 dans notre cas) de taille et de volume identique formées par une émulsion eau-huile. Chaque gouttelette peut être considérée comme un bioréacteur indépendant dans lequel prend place une réaction de PCR (en théorie, il est donc possible de réaliser 20 000 réactions de PCR en simultané). L'ADN amplifié correspondant au gène cible est marqué soit à l'aide d'une sonde *TaqMan* soit en utilisant un agent intercalant fluorescent (Eva Green). Une fois l'étape d'amplification terminée, un lecteur analyse les gouttelettes une par une et permet de discriminer les réactions positives des réactions négatives en se basant sur l'intensité de fluorescence. A partir de ces données, il est possible de déterminer de manière absolue le nombre de copies d'un gène cible par microlitre d'échantillon de départ (se base sur la Loi de Poisson ou loi des évènements rares : loi décrivant la probabilité pour qu'un évènement dont la fréquence est faible (voire moyenne) se produise dans un intervalle de temps ou un espace/volume fixé avec un nombre d'essais important). Cette méthode possède de nombreux avantages comme : une quantification absolue (contrairement à la qPCR, sous sa forme basique, qui ne donne que des données semi-quantitatives), une grande sensibilité (permet de repérer des évènements rares ou de travailler avec de faibles quantités d'ADN matrice) et une grande reproductibilité (ne nécessite pas de réplicat technique) (<https://www.bio-rad.com/fr-fr/life-science/learning-center/introduction-to-digital-pcr/what-is-droplet-digital-pcr>). Malgré ces avantages, il existe une lacune majeure faisant référence à des difficultés sur l'analyse consensuelle des données de ddPCR. Dans cette étude, nous avons choisi de présenter les résultats sous forme de ratios en s'inspirant des procédés d'analyses de données décrits en qPCR mais il aurait été possible de présenter ses résultats sous forme de nombre de copies/ μ L d'échantillon ou encore sous forme de concentration en ADN cible par échantillon. Cet appareillage étant une acquisition récente du laboratoire, nous avons suivi les recommandations du fournisseur sans optimisation préalable des protocoles concernant notamment la quantité

d'ADNc matrice utilisée (préconisée à 100 ng maximum) et les paramètres d'amplification (temps, température et nombre de cycles). La ddPCR est une méthodologie très prometteuse qui permet d'approcher la quantification absolue en limitant les écueils de la quantification relative (choix et test des gènes de référence, nombreux répliquats techniques, ...). Des étapes d'optimisation sont encore nécessaires pour s'approprier les réelles performances de cette méthodologie. Nul doute que ces nouveaux développements techniques et méthodologiques permettront de mettre en place des procédés normalisés de l'évaluation du stress dans un contexte (éco)toxicogénomique.

E. Des perspectives pour l'étude du gène *tspo* :

Les données produites dans cette étude ne permettent pas de faire un lien définitif et proportionnel entre la concentration en pesticide et la diminution de l'expression du gène *tspo*. Il serait intéressant dans un premier temps de déterminer s'il existe une relation de dose dépendance entre les xénobiotiques testés et l'expression du gène *tspo*. Il serait pertinent de réitérer ce type d'expérience sur d'autres microorganismes chez lesquels le rôle des protéines TSPO est caractérisé (comme *Rhodobacter sphaeroides* ou *Sinorhizobium meliloti*). Cela permettrait de connaître l'impact des pyréthrinoïdes sur les processus cellulaires médiés par cette famille de protéines (transition autotrophie-hétérotrophie, métabolisme des porphyrines, fonctionnement du locus *ndi*, ...) (Yeliseev and Kaplan, 1995, 1999, 2000; Davey and De Bruijn, 2000; Zeng and Kaplan, 2001; Ginter *et al.*, 2013; Batoko *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2015). Il a été rapporté dans la littérature que les insecticides pyréthrinoïdes sont capables d'interagir directement avec les protéines TSPO mais cela a été uniquement montré en de rares occasions chez les mammifères (Devaud *et al.*, 1986; Devaud and Murray, 1988; Guven *et al.*, 2018). On ne sait pas actuellement s'il en est de même pour les protéines TSPO microbiennes ou bien s'il existe une différence d'interaction entre les protéines TSPO procaryote et eucaryote pour ces xénobiotiques. Les études réalisées sur TSPO chez *P. fluorescens* se sont limitées à des études sur l'expression du gène ou sur de l'interactomique *in silico* (Chapalain *et al.*, 2009; Leneveu-Jenvrin *et al.*, 2014, 2015). Des études à l'échelle des protéines sont donc envisageables. Elles permettraient par exemple d'évaluer les potentielles interactions directes entre les pesticides et les protéines TSPO ou de montrer comment ces stress abiotiques agissent sur l'abondance et la distribution de ces protéines chez la bactérie. Des études de génétique/génomique fonctionnelle pourraient également être conduites dans le but de comprendre la (ou les) fonction(s) des protéines TSPO dans le genre *Pseudomonas*.

*Chapitre n°6 Références
bibliographiques*

- Afssa, and Afsse (2005). Evaluation des risques pour la santé humaine liés à une exposition au fipronil - Synthèse et conclusion du rapport du groupe de travail : L' exposition au fipronil pourrait-elle entraîner un risque pour l' Homme ? 1–11.
- Aktar, W., Sengupta, D., and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12. doi:10.2478/v10102-009-0001-7.
- Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M., and Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 113–122. doi:10.1897/08-110.1.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., and Martínez, M. A. (2009). Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Vet. J.* 182, 7–20. doi:10.1016/j.tvjl.2008.04.008.
- Anholt, R. R. H., De Souza, E. B., Kuhar, M. J., and Snyder, S. H. (1985). Depletion of peripheral-type benzodiazepine receptors after hypophysectomy in rat adrenal gland and testis. *Eur. J. Pharmacol.* 110, 41–46. doi:10.1016/0014-2999(85)90026-3.
- Anholt, R. R. H., Pedersen, P. L., De Souza, E. B., and Snyder, S. H. (1986). The peripheral-type benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* 261, 576–583. doi:10.1385/0-89603-078-4:415.
- Ankley, G. T., Daston, G. P., Degitz, S. J., Denslow, N. D., Hoke, R. A., Kennedy, S. W., *et al.* (2006). Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4055–4065. doi:10.1021/es0630184.
- Antwi, F. B., and Reddy, G. V. P. (2015). Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 915–923. doi:10.1016/j.etap.2015.09.023.
- Arthur, C. L., and Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145–2148. doi:10.1021/ac00218a019.
- Ashauer, R., and Brown, C. . (2008). Toxicodynamic assumptions in ecotoxicological hazard models. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1817–1821. doi:10.1016/0379-6779(92)90376-T.
- Astolfi, A., Kadri, S. M., de Castro Lippi, I. C., Mendes, D. D., Alonso, D. P., Ribolla, P. E. M., *et al.* (2022). Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. *Apidologie* 53. doi:10.1007/s13592-022-00978-7.
- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C. M., and Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 222–233. doi:10.1093/femsre/fuu013.
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., and Blot, N. (2014). Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* 9, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0091686.
- Austin, C. J. D., Kahlert, J., Kassiou, M., and Rendina, L. M. (2013). The translocator protein (TSPO): A novel target for cancer chemotherapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1212–1216. doi:10.1016/j.biocel.2013.03.004.
- Baboo, M., Pasayat, M., Samal, A., Kujur, M., Maharana, J. K., Patel, A. K., *et al.* (2013). Effect of four herbicides on soil organic carbon, microbial biomass-C, enzyme activity and

- microbial populations in agricultural soil. *Int. J. Res. Environ. Sci. Technol.* 3, 100–112.
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., Reed, J. J., Zenkevich, I. G., Brown, R. L., Mallard, W. G., *et al.* (2007). Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. *J. Chromatogr. A* 1157, 414–421. doi:10.1016/j.chroma.2007.05.044.
- Bailey, W. J., and Ulrich, R. (2004). Molecular profiling approaches for identifying novel biomarkers. *Expert Opin. Drug Saf.* 3, 137–151. doi:10.1517/14740338.3.2.137.
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., and Preston, C. A. (2006). Volatile signaling in plant-plant interactions: “Talking trees” in the genomics era. *Science* (80-.). 311, 812–815. doi:10.1126/science.1118446.
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecol. Econ.* 64, 269–285. doi:10.1016/j.ecolecon.2007.03.004.
- Batoko, H., Veljanovski, V., and Jurkiewicz, P. (2015). Enigmatic Translocator protein (TSPO) and cellular stress regulation. *Trends Biochem. Sci.* 40, 497–503. doi:10.1016/j.tibs.2015.07.001.
- Bean, H. D., Dimandja, J. M. D., and Hill, J. E. (2012). Bacterial volatile discovery using solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 901, 41–46. doi:10.1016/j.jchromb.2012.05.038.
- Berenbaum, M. R., and Johnson, R. M. (2015). Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 51–58. doi:10.1016/j.cois.2015.03.005.
- Berge, P., Ratel, J., Fournier, A., Jondreville, C., Feidt, C., Roudaut, B., *et al.* (2011). Use of volatile compound metabolic signatures in poultry liver to back-trace dietary exposure to rapidly metabolized xenobiotics. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6584–6591. doi:10.1021/es200747h.
- Bernadou, A., Démares, F., Couret-Fauvel, T., Sandoz, J. C., and Gauthier, M. (2009). Effect of fipronil on side-specific antennal tactile learning in the honeybee. *J. Insect Physiol.* 55, 1099–1106. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.08.019.
- Bijlsma, R., and Loeschcke, V. (2005). Environmental stress, adaptation and evolution: An overview. *J. Evol. Biol.* 18, 744–749. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x.
- Blum, M. S., and Brand, J. M. (1972). Social insect pheromones: Their chemistry and function. *Integr. Comp. Biol.* 12, 553–576. doi:10.1093/icb/12.3.553.
- Bonnard, N., Jagot, D., Falcy, M., Angeli, K., Fastier, A., and Rambourg, M.-O. (2012). Fiche toxicologique n°286 - Fipronil. *Base données fiches Toxicol. INRS*, 1–9.
- Boots, A. W., Smolinska, A., Van Berkel, J. J. B. N., Fijten, R. R. R., Stobberingh, E. E., Boumans, M. L. L., *et al.* (2014). Identification of microorganisms based on headspace analysis of volatile organic compounds by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Breath Res.* 8, 1–12. doi:10.1088/1752-7155/8/2/027106.
- Borbon, A., Gilman, J. B., Kuster, W. C., Grand, N., Chevaillier, S., Colomb, A., *et al.* (2013). Emission ratios of anthropogenic volatile organic compounds in northern mid-latitude megacities: Observations versus emission inventories in Los Angeles and Paris. *J. Geophys. Res. Atmos.* 118, 2041–2057. doi:10.1002/jgrd.50059.
- Borowik, A., Wyszowska, J., Kucharski, J., Baćmaga, M., and Tomkiel, M. (2017). Response

- of microorganisms and enzymes to soil contamination with a mixture of terbuthylazine, mesotrione, and S-metolachlor. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 1910–1925. doi:10.1007/s11356-016-7919-z.
- Borzelleca, J. F. (2000). Paracelsus: Herald of modern toxicology. *Toxicol. Sci.* 53, 2–4. doi:10.1093/toxsci/53.1.2.
- Bos, L. D. J., Sterk, P. J., and Schultz, M. J. (2013). Volatile metabolites of pathogens: A systematic review. *PLoS Pathog.* 9, 1–8. doi:10.1371/journal.ppat.1003311.
- Bouché, N., and Fromm, H. (2004). GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9, 110–115. doi:10.1016/j.tplants.2004.01.006.
- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H. T., Kleensang, A., and Zhao, L. (2013). Review: Toxicometabolomics. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1365–1383. doi:10.1002/jat.2874.
- Bouhlef, J., Ratel, J., Abouelkaram, S., Mercier, F., Travel, A., Baéza, E., *et al.* (2017). Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. *J. Chromatogr. A* 1497, 9–18. doi:10.1016/j.chroma.2017.03.008.
- Boverhof, D. R., and Zacharewski, T. R. (2006). Toxicogenomics in risk assessment: Applications and needs. *Toxicol. Sci.* 89, 352–360. doi:10.1093/toxsci/kfj018.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., and Allister Vale, J. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicol. Rev.* 24, 93–106. doi:10.2165/00139709-200524020-00003.
- Bradbury, S. P., and Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 108, 133–177. doi:10.1007/978-1-4613-8850-0_4.
- Braestrup, C., and Squires, R. (1977). Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity 3[H]diazepam binding. *PNAS* 74, 3805–3809.
- Broza, Y. Y., and Haick, H. (2013). Nanomaterial-based sensors for detection of disease by volatile organic compounds. *Nanomedicine* 8, 785–806. doi:10.2217/nmm.13.64.
- Broza, Y. Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., Amann, A., and Haick, H. (2015). Hybrid volatolomics and disease detection. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 11036–11048. doi:10.1002/anie.201500153.
- Brussaard, L., Behan-Pelletier, V. M., Bignell, D. E., Brown, V. K., Didden, W., Folgarait, P., *et al.* (1997). Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio* 26, 563–570. doi:10.2307/4314670.
- Bünemann, E. K., Schwenke, G. D., and Van Zwieten, L. (2006). Impact of agricultural inputs on soil organisms - A review. *Aust. J. Soil Res.* 44, 379–406. doi:10.1071/SR05125.
- Burr, S. A., and Ray, D. E. (2004). Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol. Sci.* 77, 341–346. doi:10.1093/toxsci/kfh027.
- Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simó, E., and Picó, Y. (2018). Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environ. Pollut.* 241, 106–114. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.062.
- Cappelini, L. T. D., Alberice, J. V., Eugênio, P. F. M., Pozzi, E., Urbaczek, A. C., Diniz, L. G.

- R., *et al.* (2018). *Burkholderia thailandensis*: The main bacteria biodegrading fipronil in fertilized soil with assessment by a QuEChERS/GC-MS Method. *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 1934–1943. doi:10.21577/0103-5053.20180069.
- Carles, L. (2017). Devenir de mélanges de pesticides : étude des voies de biodégradation et développement d'une méthode préventive de bioremédiation. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand. HAL Id : tel-01544582.
- Carson, R. L. (1962). *Silent Spring*. doi:10.4324/9781351279086-7.
- Carvalho, S. M., Belzunces, L. P., Carvalho, G. A., Brunet, J. L., and Badiou-Beneteau, A. (2013). Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: A case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2117–2124. doi:10.1002/etc.2288.
- Casida, J. E. (2009). Pest toxicology: The primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619. doi:10.1021/tx8004949.
- Casida, J. E. (2017). Pesticide interactions: mechanisms, benefits, and risks. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4553–4561. doi:10.1021/acs.jafc.7b01813.
- Casida, J. E., and Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology: Amounts, biology, and chemistry. *Toxicol. Res. (Camb)*. 6, 755–763. doi:10.1039/c7tx00198c.
- Casida, J. E., and Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153645.
- Casida, J. E., and Durkin, K. A. (2017). Pesticide chemical research in toxicology: Lessons from nature. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 94–104. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00303.
- Casida, J. E., Gammon, D. W., Glickman, A. H., and Lawrence, L. J. (1983). Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 413–438.
- Casida, J. E., and Quistad, G. B. (1998). Golden age of insecticide research: Past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1.
- Chapalain, A., Chevalier, S., Orange, N., Murillo, L., Papadopoulos, V., and Feuilloley, M. G. J. (2009). Bacterial ortholog of mammalian translocator protein (TSPO) with virulence regulating activity. *PLoS One* 4, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0006096.
- Chapman, P. M. (1995). Ecotoxicology and pollution-Key issues. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 167–177. doi:10.1016/0025-326X(95)00101-R.
- Chapman, P. M. (2002). Integrating toxicology and ecology: Putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 7–15. doi:10.1016/S0025-326X(01)00253-3.
- Chen, J., Tang, J., Shi, H., Tang, C., and Zhang, R. (2017). Characteristics of volatile organic compounds produced from five pathogenic bacteria by headspace-solid phase micro-extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *J. Basic Microbiol.* 57, 228–237. doi:10.1002/jobm.201600505.
- Chiron, S., Fernandez-Alba, A., Rodriguez, A., and Garcia-Calvo, E. (2000). Pesticide chemical oxidation: State-of-the-art. *Water Res.* 34, 366–377. doi:10.1016/S0043-1354(99)00173-6.
- Chowdhury, L., Croft, C. J., Goel, S., Zaman, N., Tai, A. C. S., Walch, E. M., *et al.* (2016).

- Differential potency of 2,6-dimethylcyclohexanol isomers for positive modulation of GABAA receptor currents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 357, 570–579. doi:10.1124/jpet.115.228890.
- Cicolella, A. (2008). Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. *Rev. Mal. Respir.* 25, 262. doi:10.1016/s0761-8425(08)71538-9.
- Coats, J. R., Symonik, D. M., Bradbury, S. P., Dyer, S. D., Timson, L. K., and Atchison, G. J. (1989). Toxicology of synthetic pyrethroids in aquatic organisms: An overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 671–679. doi:10.1002/etc.5620080805.
- Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., and Vermandere, J. P. (2004). A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: Relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 387–395. doi:10.1007/s00244-004-3052-y.
- Collins, A. M., and Blum, M. S. (1983). Alarm responses caused by newly identified compounds derived from the honeybee sting. *J. Chem. Ecol.* 9, 57–65.
- Connelly, P. (2001). Environmental fate of fipronil. 1–17.
- Couillerot, O., Prigent-Combaret, C., Caballero-Mellado, J., and Moëgne-Loccoz, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 505–512. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x.
- Crewe, R. M., and Blum, M. S. (1970). Alarm pheromones in the genus *Myrmica* (Hymenoptera: Formicidae) - Their composition, and species specificity. *Z. Vgl. Physiol.* 70, 363–373. doi:10.1007/BF00298191.
- Cycon, M., and Piotrowska-seget, Z. (2007). Response of soil microflora to pesticides introduced into soil-a review. *Pestycydy*, 63–82. doi:10.1201/b11864-12.
- Cycon, M., and Piotrowska-Seget, Z. (2016). Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: A review. *Front. Microbiol.* 7, 1–26. doi:10.3389/fmicb.2016.01463.
- Cycoń, M., and Piotrowska-Seget, Z. (2009). Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. *Ecotoxicology* 18, 632–642. doi:10.1007/s10646-009-0321-6.
- Cycon, M., Piotrowska-Seget, Z., and Kaczynska, A. (2005). Soil enzyme activities as indicator of soil pollution by pesticides. *Pestycydy* 11, 35–45. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/248393908>.
- Da Silva Cruz, A., Da Silva-Zacarin, E. C. M., Bueno, O. C., and Malaspina, O. (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biol. Toxicol.* 26, 165–176. doi:10.1007/s10565-009-9126-x.
- Damalas, C. A., and Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1402–1419. doi:10.3390/ijerph8051402.
- Das, A. C., Chakravarty, A., Sukul, P., and Mukherjee, D. (1995). Insecticides: their effect on microorganisms and persistence in rice soil. *Microbiol. Res.* 150, 187–194.

doi:10.1016/S0944-5013(11)80055-8.

- Das, A. C., and Mukherjee, D. (1998). Insecticidal effects on soil microorganisms and their biochemical processes related to soil fertility. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 903–909. doi:10.1023/A:1008820908917.
- Das, A. C., and Mukherjee, D. (2000a). Influence of insecticides on microbial transformation of nitrogen and phosphorus in typic Orchragualf soil. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3728–3732. doi:10.1021/jf990811q.
- Das, A. C., and Mukherjee, D. (2000b). Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Appl. Soil Ecol.* 14, 55–62. doi:10.1016/S0929-1393(99)00042-6.
- Davey, M. E., and De Bruijn, F. J. (2000). A homologue of the tryptophan-rich sensory protein TspO and fixL regulate a novel nutrient deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5353–5359. doi:10.1128/AEM.66.12.5353-5359.2000.
- Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R., and Williamson, M. S. (2007). DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life* 59, 151–162. doi:10.1080/15216540701352042.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W., and Tomberlin, J. K. (2013). Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *J. Chem. Ecol.* 39, 840–859. doi:10.1007/s10886-013-0306-z.
- Day, K. E. (1989). Acute, chronic and sublethal effects of synthetic pyrethroids [permethrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate] on freshwater zooplankton. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 411–416.
- Decaprio, A. P. (1997). Biomarkers: Coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1837–1848. doi:10.1021/es960920a.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J., *et al.* (2011). Honeybee tracking with microchips: A new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology* 20, 429–437. doi:10.1007/s10646-011-0594-4.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., *et al.* (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 242–250. doi:10.1007/s00244-003-0262-7.
- Decourtye, A., Lefort, S., Devillers, J., Gauthier, M., Aupinel, P., and Tisseur, M. (2009). Sublethal effects of fipronil on the ability of honeybees (*Apis mellifera* L.) to orientate in a complex maze. *Julius-Kühn-Archiv* 423, 75–83.
- Defois, C., Ratel, J., Denis, S., Batut, B., Beugnot, R., Peyretailade, E., *et al.* (2017). Environmental pollutant Benzo[a]Pyrene impacts the volatile metabolome and transcriptome of the human gut microbiota. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.01562.
- Defois, C., Ratel, J., Garrat, G., Denis, S., Le Goff, O., Talvas, J., *et al.* (2018). Food chemicals disrupt human gut microbiota activity and impact intestinal homeostasis as revealed by *in vitro* systems. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-29376-9.
- Delavoie, F., Li, H., Hardwick, M., Robert, J. C., Giatzakis, C., Péranzi, G., *et al.* (2003). *In*

- vivo* and *in vitro* peripheral-type benzodiazepine receptor polymerization: Functional significance in drug ligand and cholesterol binding. *Biochemistry* 42, 4506–4519. doi:10.1021/bi0267487.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., and Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 84–98. doi:10.1002/etc.5620200108.
- Delory, B. M., Delaplace, P., Fauconnier, M. L., and du Jardin, P. (2016). Root-emitted volatile organic compounds: Can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil* 402, 1–26. doi:10.1007/s11104-016-2823-3.
- Depayras, S. (2019). Etude des mécanismes de détection, d’adaptation et de protection d’une souche de *Pseudomonas fluorescens* isolée de l’air en réponse au NO₂ gazeux, marqueur de pollution automobile. Université de Rouen Normandie. Evreux.
- Desneux, N., Decourtye, A., and Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.
- Devaud, L. L., and Murray, T. F. (1988). Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247, 14–22.
- Devaud, L. L., Szot, P., and Murray, T. F. (1986). PK 11195 Antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity. *Eur. J. Pharmacol.* 120, 269–273.
- Dolch, M. E., Hornuss, C., Klocke, C., Praun, S., Villinger, J., Denzer, W., *et al.* (2012a). Volatile compound profiling for the identification of Gram-negative bacteria by ion-molecule reaction-mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1097–1105. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05414.x.
- Dolch, M. E., Hornuss, C., Klocke, C., Praun, S., Villinger, J., Denzer, W., *et al.* (2012b). Volatile organic compound analysis by ion molecule reaction mass spectrometry for Gram-positive bacteria differentiation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 3007–3013. doi:10.1007/s10096-012-1654-2.
- Douglas, M. R., Sponsler, D. B., Lonsdorf, E. V., and Grozinger, C. M. (2020). County-level analysis reveals a rapidly shifting landscape of insecticide hazard to honey bees (*Apis mellifera*) on US farmland. *Sci. Rep.* 10, 1–11. doi:10.1038/s41598-019-57225-w.
- Dudley, N., and Alexander, S. (2017). Agriculture and biodiversity: a review. *Biodiversity* 18, 1–5. doi:10.1080/14888386.2017.1351892.
- Duffus, J. H., Templeton, D. M., and Nordberg, M. (2009a). Concept Group 1. Concepts Applying to Fundamental Principles of Toxicology, in *Concepts in Toxicology*, 13–51.
- Duffus, J. H., Templeton, D. M., and Nordberg, M. (2009b). Concept Group 2. Concepts Applying to Molecular and Cellular Toxicology, in *Concepts in Toxicology*, 52–99. doi:10.1039/9781847559753-00052.
- Duffus, J. H., Templeton, D. M., and Nordberg, M. (2009c). Concept Group 3 . Concepts Applying to Whole Organism Toxicology, in *Concepts in Toxicology*, 100–152.
- Duffus, J. H., Templeton, D. M., and Nordberg, M. (2009d). Concept Group 4. Concepts Applying to Environmental Toxicology, in *Concepts in Toxicology*, 153–173.

- Dufresne, M. (2022). Sources et déterminants des composés organiques volatils à Marseille. Ecole Nationale Supérieure Mines-Télécom Lille Douais. <https://theses.hal.science/tel-04018229/document>
- Duke, S. O., and Dayan, F. E. (2011). Bioactivity of Herbicides, in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Elsevier B.V.), 23–35. doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00273-7.
- Dunn, W. B., and Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends Anal. Chem.* 24, 285–294. doi:10.1016/j.trac.2004.11.021.
- Eason, C., and O'Halloran, K. (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* 181, 517–521. doi:10.1016/S0300-483X(02)00472-9.
- Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., and Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.* 38, 665–703. doi:10.1007/s10886-012-0135-5.
- El-Ghany, N. M. A. (2019). Semiochemicals for controlling insect pests. *J. Plant Prot. Res.* 59, 1–11. doi:10.24425/jppr.2019.126036.
- El-Sayed, A. M. (2023). The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. Available at: <https://www.pherobase.com/>.
- El Hassani, A. K., Dacher, M., Gauthier, M., and Armengaud, C. (2005). Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 30–39. doi:10.1016/j.pbb.2005.07.008.
- Fan, J., Lindemann, P., G.J. Feuilloley, M., and Papadopoulos, V. (2012). Structural and functional evolution of the translocator protein (18 kDa). *Curr. Mol. Med.* 12, 369–386. doi:10.2174/1566524011207040369.
- Fan, J., and Papadopoulos, V. (2013). Evolutionary origin of the mitochondrial cholesterol transport machinery reveals a universal mechanism of steroid hormone biosynthesis in animals. *PLoS One* 8, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0076701.
- Feldhaar, H., and Otti, O. (2020). Pollutants and their interaction with diseases of social hymenoptera. *Insects* 11, 1–20. doi:10.3390/insects11030153.
- Fernandes, V., Hidalgo, K., Diogon, M., Mercier, F., Angénieux, M., Ratel, J., *et al.* (2023). A GABA receptor modulator and semiochemical compounds evidenced using volatolomics as candidate markers of chronic exposure to fipronil in *Apis mellifera*. *Metabolites* 13. doi:10.3390/metabo13020185.
- Filimon, M. N., Voia, S. O., Popescu, R., Dumitrescu, G., Ciochina, L. P., Mituletu, M., *et al.* (2015). The effect of some insecticides on soil microorganisms based on enzymatic and bacteriological analyses. *Rom. Biotechnol. Lett.* 20, 10439–10447.
- Flores, J. M., Gil-Lebrero, S., Gámiz, V., Rodríguez, M. I., Ortiz, M. A., and Quiles, F. J. (2019). Effect of the climate change on honey bee colonies in a temperate Mediterranean zone assessed through remote hive weight monitoring system in conjunction with exhaustive colonies assessment. *Sci. Total Environ.* 653, 1111–1119. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.004.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A., and Bach, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 272–280. doi:10.1897/05-257R.1.

- FRAC MoA working group (2022). Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action. Available at: https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2.
- Frank, W., Baar, K. M., Qudeimat, E., Woriedh, M., Alawady, A., Ratnadewi, D., *et al.* (2007). A mitochondrial protein homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor is essential for stress adaptation in plants. *Plant J.* 51, 1004–1018. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03198.x.
- Gaines, A., Ludovice, M., Xu, J., Zanghi, M., Meinersmann, R. J., Berrang, M., *et al.* (2019). The dialogue between protozoa and bacteria in a microfluidic device. *PLoS One* 14, 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0222484.
- Gajendiran, A., and Abraham, J. (2018). An overview of pyrethroid insecticides. *Front. Biol. (Beijing)*. 13, 79–90. doi:10.1007/s11515-018-1489-z.
- Galloway, T. S., Brown, R. J., Browne, M. A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M. B., *et al.* (2004). A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1723–1731. doi:10.1021/es030570+.
- Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., *et al.* (1999). Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* 51, 629–650.
- Ge, Y., Wang, D. Z., Chiu, J. F., Cristobal, S., Sheehan, D., Silvestre, F., *et al.* (2013). Environmental OMICS: Current status and future directions. *J. Integr. OMICS* 3, 75–87. doi:10.5584/jiomics.v3i2.141.
- Gera Hol, W. H., Martijn Bezemer, T., and Biere, A. (2013). Getting the ecology into interactions between plants and the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Front. Plant Sci.* 4, 1–9. doi:10.3389/fpls.2013.00081.
- Giannoukos, S., Agapiou, A., Brkić, B., and Taylor, S. (2019). Volatolomics: A broad area of experimentation. *J. Chromatogr. B* 1105, 136–147. doi:10.1016/j.jchromb.2018.12.015.
- Gibbons, D., Morrissey, C., and 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. doi:10.1007/s11356-014-3180-5.
- Ginter, C., Kiburu, I., and Boudker, O. (2013). Chemical catalysis by the translocator protein (18 kDa). *Biochemistry* 52, 3609–3611. doi:10.1021/bi400364z.
- Goldstein, A. ., and Galbally, I. (2007). Known and unexplored organic constituents in the Earth's atmosphere. *Environ. Sci. Technol.*, 1515–1521. Available at: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>.
- Gong, Y., and Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 0–1. doi:10.1007/s10646-016-1742-7.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., and Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Sci. express*, 1–16.
- Grandjean, P. (2016). Paracelsus revisited: The dose concept in a complex world. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 126–132. doi:10.1111/bcpt.12622.
- Grech, A., Brochot, C., Dorne, J. Lou, Quignot, N., Bois, F. Y., and Beaudouin, R. (2016). Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. *Sci. Total Environ.*, 1–15. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.146.

- Guillaumot, D., Guillon, S., Déplanque, T., Vanhee, C., Gumy, C., Masquelier, D., *et al.* (2009). The *Arabidopsis* TSPO-related protein is a stress and abscisic acid-regulated, endoplasmic reticulum-Golgi-localized membrane protein. *Plant Journal* *Plant J.* 60, 242–256. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03950.x.
- Gunasekara, A. S., Truong, T., Goh, K. S., Spurlock, F., and Tjeerdema, R. S. (2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *J. Pestic. Sci.* 32, 189–199. doi:10.1584/jpestics.R07-02.
- Guo, Y., Jud, W., Ghirardo, A., Anritter, F., Benz, J. P., Schnitzler, J. P., *et al.* (2020). Sniffing fungi – phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytol.* 227, 244–259. doi:10.1111/nph.16530.
- Guo, Y., Jud, W., Weikl, F., Ghirardo, A., Junker, R. R., Polle, A., *et al.* (2021). Volatile organic compound patterns predict fungal trophic mode and lifestyle. *Commun. Biol.* 4, 1–12. doi:10.1038/s42003-021-02198-8.
- Guo, Y., Kalathur, R. C., Liu, Q., Kloss, B., Bruni, R., Ginter, C., *et al.* (2015). Structure and activity of tryptophan-rich TSPO translocator proteins. *Science (80-)*. 347, 551–555. doi:10.1126/science.aaa1534.Structure.
- Guo, Z., Gong, J., Luo, S., Zuo, Y., and Shen, Y. (2023). Role of gamma-aminobutyric acid in plant defense response.
- Gut, P., Zweckstetter, M., and Banati, R. B. (2015). Lost in translocation : The function of the 18 kD translocator protein. *Trens Endocrinol. Metab.* 26, 349–356. doi:10.1016/j.tem.2015.04.001.Lost.
- Guyen, C., Sevgiler, Y., and Taskin, E. (2018). Chapter 12: Pyrethroid insecticides as the mitochondrial dysfunction inducers, in *Mitochondrial Diseases*, 293–322. doi:10.5772/intechopen.80283.
- Hachez, C., Veljanovski, V., Reinhardt, H., Guillaumot, D., Vanhee, C., Chaumont, F., *et al.* (2014). The *Arabidopsis* abiotic stress-induced Tspo-related protein reduces cell-surface expression of the aquaporin PIP2;7 through protein-protein interactions and autophagic degradation. *Plant Cell* 26, 4974–4990. doi:10.1105/tpc.114.134080.
- Hainzl, D., Cole, L. M., and Casida, J. E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1529–1535. doi:10.1021/tx980157t.
- Hakim, M., Broza, Y. Y., Barash, O., Peled, N., Phillips, M., Amann, A., *et al.* (2012). Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways. *Chem. Rev.* 112, 5949–5966. doi:10.1021/cr300174a.
- Hall, A. C., Griffith, T. N., Tsikolia, M., Kotey, F. O., Gill, N., Humbert, D. J., *et al.* (2011). Cyclohexanol analogues are positive modulators of GABA A receptor currents and act as general anaesthetics *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 667, 175–181. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.058.
- Hamadeh, H. K., Amin, R. P., Paules, R. S., and Afshari, C. A. (2002). An overview of toxicogenomics. *Curr. Issues Mol. Biol.* 4, 45–56. doi:10.21775/cimb.004.045.
- Handy, R. D., Galloway, T. S., and Depledge, M. H. (2003). A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–343. doi:10.1023/A:1022527432252.

- Hayward, S. A. L. (2014). Application of functional “Omics” in environmental stress physiology: Insights, limitations, and future challenges. *Curr. Opin. Insect Sci.* 4, 35–41. doi:10.1016/j.cois.2014.08.005.
- Hefetz, A., and Batra, S. W. T. (1979). Geranyl acetate and 2-decen-1-ol in the cephalic secretion of the solitary wasp *Sceliphron caementarium* (Sphecidae; Hymenoptera). *Experientia* 35, 1138–1139. doi:10.1007/BF01963245.
- Heijne, W. H. M., Kienhuis, A. S., Van Ommen, B., Stierum, R. H., and Groten, J. P. (2005). Systems toxicology: Applications of toxicogenomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics in toxicology. *Expert Rev. Proteomics* 2, 767–780. doi:10.1586/14789450.2.5.767.
- Hidalgo, K., Ratel, J., Mercier, F., Gauriat, B., Bouchard, P., and Engel, E. (2019). Volatolomics in bacterial ecotoxicology, a novel method for detecting signatures of pesticide exposure? *Front. Microbiol.* 10, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2018.03113.
- Hirano, M. (1989). Characteristics of pyrethroids for insect pest control in agriculture. *Pestic. Sci.* 27, 353–360. doi:10.1002/ps.2780270404.
- Holzschuh, A., Steffan-Dewenter, I., Kleijn, D., and Tscharnkte, T. (2007). Diversity of flower-visiting bees in cereal fields: Effects of farming system, landscape composition and regional context. *J. Appl. Ecol.* 44, 41–49. doi:10.1111/j.1365-2664.2006.01259.x.
- Hossain, S. J., Aoshima, H., Koda, H., and Kiso, Y. (2003). Effects of coffee components on the response of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7568–7575. doi:10.1021/jf0303971.
- HRAC MoA Working group (2020). Global HRAC MOA Classification Working Group Report.
- Hung, K. L. J., Kingston, J. M., Albrecht, M., Holway, D. A., and Kohn, J. R. (2018). The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B* 285, 1–8. doi:10.1098/rspb.2017.2140.
- Hussain, S. Z., and Maqbool, K. (2014). GC-MS: Principle, technique and its application in food science. *Int. J. Curr. Sci.* 13, 116–126.
- IRAC MoA Working group (2023). IRAC Mode of Action Classification Scheme.
- Jaremko, Ł., Jaremko, M., Becker, S., and Zweckstetter, M. (2014). Toward the functional oligomerization state of tryptophan-rich sensory proteins. *Protein Sci.* 23, 1154–1160. doi:10.1002/pro.2487.
- Jaremko, Ł., Jaremko, M., Giller, K., Becker, S., and Zweckstetter, M. (2015). Conformational flexibility in the transmembrane protein TSPO. *Chemistry (Easton)*. 21, 16555–16563. doi:10.1002/chem.201502314.Conformational.
- Johnson, R. M. (2015). Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 415–434. doi:10.1146/annurev-ento-011613-162005.
- Johnston, G. A R. (2006). Receptor channel pharmacology. *Receptor*, 1867–1885.
- Joseph, C., Delattre, D., and Sarthou, J.-P. (2018). Auxiliaires des cultures. *Dict. d’agroécologie*. Available at: dicoagroecologie.fr/encyclopedie/auxiliaires-des-cultures/%0ANiveau.

- Jousse, C., and Pujos-Guillot, E. (2013). Chapter six: Exploring metabolome with GC/MS, in *Advances in Botanical Research* (Elsevier Ltd.), 303–329. doi:10.1016/B978-0-12-397922-3.00006-X.
- Jünger, M., Vautz, W., Kuhns, M., Hofmann, L., Ulbricht, S., Baumbach, J. I., *et al.* (2012). Ion mobility spectrometry for microbial volatile organic compounds: A new identification tool for human pathogenic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 2603–2614. doi:10.1007/s00253-012-3924-4.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., and Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1001–1012. doi:10.1007/s00253-008-1760-3.
- Kairo, G., Biron, D. G., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M., *et al.* (2017). *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-08380-5.
- Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Cousin, M., *et al.* (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Sci. Rep.* 6, 1–12. doi:10.1038/srep31904.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070.
- Kasinger, H., Bauer, B., and Denzinger, J. (2008). The meaning of semiochemicals to the design of self-organizing systems. in *Second IEEE International Conference on Self-Adaptive and Self-Organizing Systems*, 139–148. doi:10.1109/SASO.2008.51.
- Katagi, T. (2004). Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. doi:10.1007/978-1-4419-9098-3_1.
- Katagi, T. (2012). Environmental Behavior of Synthetic Pyrethroids, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- Katsuda, Y. (2012). Progress and Future of Pyrethroids, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- Kaur, R., Singh, D., Kumari, A., Sharma, G., Rajput, S., Arora, S., *et al.* (2021). Pesticide residues degradation strategies in soil and water: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 1–24. doi:10.1007/s13762-021-03696-2.
- Khanna, V., Jordan, A., Patch, H. M., and Grozinger, C. M. (2021). Economic dependence and vulnerability of United States agricultural sector on insect-mediated pollination service. *Environ. Sci. Technol.* 55, 2243–2253. doi:10.1021/acs.est.0c04786.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., *et al.* (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B* 274, 303–313. doi:10.1098/rspb.2006.3721.
- Köksal, B. (2015). Cytotoxic and neurotoxic effects of 1-octen-3-ol on learning and memory functions of brain. *Adv. Biol. Res.* 9 9, 444–448. doi:10.5829/idosi.abr.2015.9.6.101193.
- Koren, H., and Bisesi, M. (1996). 1. Environment and Humans, in *Handbook of Environmental Health and Safety - Principles and Practices Volume I*.

- Korkhov, V. M., Sachse, C., Short, J. M., and Tate, C. G. (2010). Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Structure* 18, 677–687. doi:10.1016/j.str.2010.03.001.
- Korpi, A., Järnberg, J., and Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 139–193. doi:10.1080/10408440802291497.
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., and Given, K. (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0029268.
- Lacapère, J. J., and Papadopoulos, V. (2003). Peripheral-type benzodiazepine receptor: Structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68, 569–585. doi:10.1016/S0039-128X(03)00101-6.
- Lam, P. K. S., and Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 182–186. doi:10.1016/S0025-326X(02)00449-6.
- Lamberth, C. (2019). Small ring chemistry in crop protection. *Tetrahedron* 75, 4365–4383. doi:10.1016/j.tet.2019.06.043.
- Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T., and Plant, A. (2013). Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science*. 341, 742–746. doi:10.1126/science.1237227.
- Landis, W. G., Rohr, J. R., Moe, S. J., Balbus, J. M., Clements, W., Fritz, A., *et al.* (2014). Global climate change and contaminants, a call to arms not yet heard? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 483–484. doi:10.1002/ieam.1568.
- Larsen, A. E., and Noack, F. (2017). Identifying the landscape drivers of agricultural insecticide use leveraging evidence from 100,000 fields. *PNAS* 115, 5473–5478. doi:10.1073/pnas.1721250115.
- Lawrence, L., and Casida, J. E. (1982). Pyrethroid toxicology: Mouse intracerebral relationships. *Pestic. Biochem. Physiol.* 18, 9–14.
- Le Conte, Y., and Navajas, M. (2008). Changements climatiques: Impact sur les populations d'abeilles et leurs maladies. *Rev. Sci. Tech. l'Office Int. des Epizoot.* 27, 485–510. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-53349153176&partnerID=tZOtx3y1>.
- Lemfack, M. C., Gohlke, B. O., Toguem, S. M. T., Preissner, S., Piechulla, B., and Preissner, R. (2018). MVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* 46, D1261–D1265. doi:10.1093/nar/gkx1016.
- Leneuve-Jenvrin, C., Bouffartigues, E., Maillot, O., Cornelis, P., Feuilleley, M. G. J., Connil, N., *et al.* (2015). Expression of the translocator protein (TSPO) from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 requires the stress regulatory sigma factors AlgU and RpoH. *Front. Microbiol.* 6, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2015.01023.
- Leneuve-Jenvrin, C., Connil, N., Bouffartigues, E., Papadopoulos, V., Feuilleley, M. G. J., and Chevalier, S. (2014). Structure-to-function relationships of bacterial translocator protein (TSPO): A focus on *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 5, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2014.00631.
- Leroy, P. D., Sabri, A., Verheggen, F. J., Francis, F., Thonart, P., and Haubruge, E. (2011). The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. *Chemoecology* 21,

113–122. doi:10.1007/s00049-011-0074-6.

- Li, F., Liu, J., Liu, N., Kuhn, L. A., Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2016). Translocator protein 18 kDa (TSPO): An old protein with new functions? *Biochemistry* 55, 2821–2831. doi:10.1021/acs.biochem.6b00142.
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C. (2021). The versatile GABA in plants. *Plant Signal. Behav.* 16. doi:10.1080/15592324.2020.1862565.
- Lindemann, P., Koch, A., Degenhardt, B., Hause, G., Grimm, B., and Papadopoulos, V. (2004). A novel *Arabidopsis thaliana* protein is a functional peripheral-type benzodiazepine receptor. *Plant Cell Physiol.* 45, 723–733. doi:10.1093/pcp/pch088.
- Liu, J., Rone, M. B., and Papadopoulos, V. (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 281, 38879–38893. doi:10.1074/jbc.M608820200.
- Madsen, E. L. (2011). Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 456–464. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.008.
- Maier, R. M. (2015). Chapter 16 Biogeochemical Cycling, in *Environmental Microbiology: Third Edition* (Elsevier Inc.), 339–373. doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00016-8.
- Marchall Clark, J., and Symington, S. B. (2012). Advances in the Mode of Action of Pyrethroids, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- Marican, A., and Durán-Lara, E. F. (2017). A review on pesticide removal through different processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 1–15. doi:10.1007/s11356-017-0796-2.
- Martins, C., Dreij, K., and Costa, P. M. (2019). The state-of-the art of environmental toxicogenomics: Challenges and perspectives of “omics” approaches directed to toxicant mixtures. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 1–16. doi:10.3390/ijerph16234718.
- Martyniuk, C. J., and Simmons, D. B. (2016). Spotlight on environmental omics and toxicology: a long way in a short time. *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 19, 97–101. doi:10.1016/j.cbd.2016.06.010.
- Matsuda, K. (2012). Pyrethrin Biosynthesis and its Regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- Matsuo, N. (2019). Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 95, 378–400.
- Maund, S. J., Campbell, J. M., Giddings, J. M., Hamer, M. J., Henry, K., Pilling, E. D., et al. (2012). Ecotoxicology of Synthetic Pyrethroids, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- McKinney, J. D., Richard, A., Waller, C., Newman, M. C., and Gerberick, F. (2000). The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicol. Sci.* 56, 8–17. doi:10.1093/toxsci/56.1.8.
- Meng, X., Guo, Y., Wang, Y., Fan, S., Wang, K., and Han, W. (2022). A systematic review of photolysis and hydrolysis degradation modes, degradation mechanisms, and identification methods of pesticides. *J. Chem.*, 1–13. doi:10.1155/2022/9552466.

- Mikita, K., Isobe, N., and Kaneko, H. (2012). Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide (Topics in Current Chemistry)*.
- Miransari, M. (2011). Soil microbes and plant fertilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 875–885. doi:10.1007/s00253-011-3521-y.
- Moore, M. N., Depledge, M. H., Readman, J. W., and Paul Leonard, D. R. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552, 247–268. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.028.
- Morandin, L. A., and Winston, M. L. (2006). Pollinators provide economic incentive to preserve natural land in agroecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 116, 289–292. doi:10.1016/j.agee.2006.02.012.
- Morath, S. U., Hung, R., and Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* 26, 73–83. doi:10.1016/j.fbr.2012.07.001.
- Mueller-Beilschmidt, D. (1990). Toxicology and environmental fate of synthetic pyrethroids. *J. Pestic. Reform* 10, 32–37.
- Müller, A., Faubert, P., Hagen, M., zu Castell, W., Polle, A., Schnitzler, J. P., *et al.* (2013). Volatile profiles of fungi - Chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genet. Biol.* 54, 25–33. doi:10.1016/j.fgb.2013.02.005.
- Murcia Morales, M., Gómez Ramos, M. J., Parrilla Vázquez, P., Díaz Galiano, F. J., García Valverde, M., Gámiz López, V., *et al.* (2020). Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. *Sci. Total Environ.* 710, 1–10. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136288.
- Nakagawa, T. (2018). Insect repellent, US Patent US 20180064109A1.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., and Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655–670. doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x.
- Narahashi, T. (1971). Mode of action of pyrethroids. *Bull. World Health Organ.* 44, 337–345. doi:10.1016/b978-0-12-177120-1.50006-0.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V. L., and Yeh, jay. Z. (2010). Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals. *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 149–152. doi:10.1016/j.pestbp.2009.07.008.Glutamate-activated.
- Netzker, T., Shepherdson, E. M. F., Zambri, M. P., and Elliot, M. A. (2020). Bacterial volatile compounds: Functions in communication, cooperation, and competition. *Annu. Rev. Microbiol.* 74, 409–430. doi:10.1146/annurev-micro-011320-015542.
- Nicodemo, D., Maioli, M. A., Medeiros, H. C. D., Guelfi, M., Balieira, K. V. B., De Jong, D., *et al.* (2014). Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2070–2075. doi:10.1002/etc.2655.
- Nuwaysir, E. F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J. C., and Afshari, C. A. (1999). Microarrays and toxicology: The advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.* 24, 153–159. doi:10.1002/(SICI)1098-2744(199903)24:3<153::AID-MC1>3.0.CO;2-P.

- Oerke, E. C., and Dehne, H. W. (2004). Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* 23, 275–285. doi:10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- Ollerton, J. (2017). Pollinator diversity: Distribution, ecological function, and conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48, 353–376. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110316-022919.
- Ollerton, J., Winfree, R., and Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x.
- Ouyang, G., Vuckovic, D., and Pawliszyn, J. (2011). Nondestructive sampling of living systems using *in vivo* solid-phase microextraction. *Chem. Rev.* 111, 2784–2814. doi:10.1021/cr100203t.
- Palmquist, K., Salatas, J., and Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology, in *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*, 251–278. doi:10.5772/29495.
- Papadopoulos, V., Aghazadeh, Y., Fan, J., Campioli, E., Zirkin, B., and Midzak, A. (2015). Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 90–98. doi:10.1016/j.mce.2015.03.014.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapère, J. J., Lindemann, P., *et al.* (2006). Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 402–409. doi:10.1016/j.tips.2006.06.005.
- Papet, Y., Brunet, B., and Mura, P. (2010). Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME). Théorie et applications. *Ann. Toxicol. Anal.* 22, 75–79. doi:10.1051/ata/2010022.
- Paris, L. (2017). Analyse des interactions entre le parasite *Nosema ceranae* et l'insecticide fipronil chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01764895>.
- Peng, G., Hakim, M., Broza, Y. Y., Billan, S., Abdah-Bortnyak, R., Kuten, A., *et al.* (2010). Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. *Br. J. Cancer* 103, 542–551. doi:10.1038/sj.bjc.6605810.
- Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B., *et al.* (2014). Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell Environ.* 37, 1866–1891. doi:10.1111/pce.12340.
- Pickett, J. A., Williams, I. H., Martin, A. P., and Smith, M. C. (1980). Nasonov pheromon of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part I. Chemical characterization. *J. Chem. Ecol.* 6, 425–434. doi:10.1007/bf01402919.
- Pickett, J. A., Williams, I. H., Smith, M. C., and Martin, A. P. (1981). Nasonov pheromon of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part III. Regulation of pheromone composition and production. *J. Chem. Ecol.* 7, 543–554. doi:10.1007/BF00987702.
- Pimentel, D. (1996). Green revolution agriculture and chemical hazards. *Sci. Total Environ.* 188. doi:10.1016/0048-9697(96)05280-1.
- Pimentel, D. (2009). Chapter 3: Pesticide and pest control, in *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, 83–87. doi:10.1007/978-1-4020-8992-3.
- Pimentel, D., and Burgess, M. (2014a). Chapter 1: Pesticides applied worldwide to combat pests, in *Integrated Pest Management*, 1–12. doi:10.1007/978-94-007-7802-3.

- Pimentel, D., and Burgess, M. (2014b). Chapter 5: Environmental and economic benefits of reducing pesticide use, in *Integrated Pest Management*, 127–139. doi:10.1007/978-94-007-7796-5.
- Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., *et al.* (1993). Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 46, 273–288. doi:10.1016/0167-8809(93)90030-S.
- Pisa, L. W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Downs, C. A., Goulson, D., *et al.* (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 68–102. doi:10.1007/s11356-014-3471-x.
- Polizzi, V., Adams, A., Malysheva, S. V., De Saeger, S., Van Peteghem, C., Moretti, A., *et al.* (2012). Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. *Fungal Biol.* 116, 941–953. doi:10.1016/j.funbio.2012.06.001.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., and Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007.
- Probert, C. S. J., Ahmed, F., Khalid, T., Johnson, E., Smith, S., and Ratcliffe, N. (2009). Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 18, 337–343.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., and de Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 81, 537–547. doi:10.1023/A:1020501420831.
- Rad, S. M., Ray, A. K., and Barghi, S. (2022). Water pollution and agriculture pesticide. *Clean Technol.* 4, 1088–1102. doi:10.3390/cleantechnol4040066.
- Ramade, F. (2005). Chapitre 2. Le problème des pollutions et ses implications écologiques, in *Éléments d'écologie - écologie appliquée*.
- Ramade, F. (2007a). 1. Définition de l'écotoxicologie, place parmi les sciences biologiques, in *Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications*.
- Ramade, F. (2007b). 3. Dispersion et circulation des polluants dans l'écosphère, in *Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications*.
- Ramade, F. (2007c). 4. Notion de toxique et implications écologiques, in *Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications*.
- Ramade, F. (2007d). 5. Détermination des principaux paramètres écotoxicologiques quantitatifs, in *Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications*.
- Ramchandra, A. M., Chacko, B., and Victor, P. J. (2019). Pyrethroid poisoning. *Indian J. Crit. Care Med.* 23, S267–S271. doi:10.5005/jp-journals-10071-23304.
- Rashed, M. N., El-Haty, M. T. A., and Mohamed, S. M. (2009). Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. *Toxicol. Environ. Chem.* 91, 389–403. doi:10.1080/02772240802294870.
- Ratel, J., and Engel, E. (2009). Determination of benzenic and halogenated volatile organic compounds in animal-derived food products by one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 7889–7898.

doi:10.1016/j.chroma.2009.09.012.

- Ratel, J., Mercier, F., Angénieux, M., Kondjoyan, N., Abouelkaram, S., Blinet, P., *et al.* (2022). Identification by volatolomics of hydrocarbon, oxygenated, sulfur and aromatic markers of livestock exposure to α -hexabromocyclododecane. *Food Chem.* 374, 1–8. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131504.
- Ratel, J., Planche, C., Mercier, F., Blinet, P., Kondjoyan, N., Marchand, P., *et al.* (2017). Liver volatolomics to reveal poultry exposure to g-hexabromocyclododecane (HBCD). *Chemosphere* 189, 634–642. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.074.
- Ratra, G. S., Kamita, S. G., and Casida, J. E. (2001). Role of human GABAA receptor β 3 subunit in insecticide toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 233–240. doi:10.1006/taap.2001.9154.
- Ravula, A. R., and Yenugu, S. (2021). Pyrethroid based pesticides—chemical and biological aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 51, 117–140. doi:10.1080/10408444.2021.1879007.
- Ray, D. E., and Forshaw, P. J. (2000). Pyrethroid insecticides: Poisoning syndromes, synergies, and therapy. *J. Toxicol. - Clin. Toxicol.* 38, 95–101. doi:10.1081/CLT-100100922.
- Reo, N. V. (2002). NMR-based metabolomics. *Drug Chem. Toxicol.* 25, 375–382. doi:10.1081/DCT-120014789.
- Richards, A. J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? *Ann. Bot.* 88, 165–172. doi:10.1006/anbo.2001.1463.
- Riond, J., Leplatois, P., Laurent, P., Le Fur, G., Caput, D., Loison, G., *et al.* (1991). Expression and pharmacological characterization of the human peripheral-type benzodiazepine receptor in yeast. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 208, 307–312. doi:10.1016/0922-4106(91)90076-T.
- Roat, T. C., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., Silva-Zacarin, E. C. M., Palma, M. S., and Malaspina, O. (2013). Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 456–466. doi:10.1007/s00244-012-9849-1.
- Roat, T. C., Carvalho, S. M., Palma, M. S., and Malaspina, O. (2017). Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 1652–1660. doi:https://doi.org/10.1002/etc.3699.
- Rocco, M. (2021). Analyse des déterminants de la distribution des composés organiques volatils en milieux naturels contrastés. Université Clermont Auvergne. Clermont-Ferrand. <https://theses.hal.science/tel-03662499/>
- Rochat, D., Ramirez-Lucas, P., Malosse, C., Aldana, R., Kakul, T., and Morin, J. P. (2000). Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *J. Chromatogr. A* 885, 433–444. doi:10.1016/S0021-9673(99)01049-3.
- Rone, M. B., Midzak, A. S., Issop, L., Rammouz, G., Jagannathan, S., Fan, J., *et al.* (2012). Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 26, 1868–1882. doi:10.1210/me.2012-1159.
- Rouzé, R. (2020). Impacts et interactions de la microsporidie *Nosema cerenae* et d'insecticides

- neurotoxiques sur la santé de l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Université Clermont Auvergne. Clermont-Ferrand. <https://theses.hal.science/tel-03369414/>
- Rouzé, R., Moné, A., Delbac, F., Belzunces, L., and Blot, N. (2019). The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ.* 34, 226–233. doi:10.1264/jsme2.ME18169.
- Rowan, D. D. (2011). Volatile metabolites. *Metabolites* 1, 41–63. doi:10.3390/metabo1010041.
- Rozman, K. K., and Doull, J. (2000). Dose and time as variables of toxicity. *Toxicology* 144, 169–178. doi:10.1016/S0300-483X(99)00204-8.
- Saeed, A., Larik, F. A., and Channar, P. A. (2016). Recent synthetic approaches to fipronil, a super-effective and safe pesticide. *Res. Chem. Intermed.* 42, 6805–6813. doi:10.1007/s11164-016-2527-6.
- Saha, T., and Chandran, N. (2017). Chemical ecology and pest management: A review. *Int. J. Chem. Stud.* 5, 618–621.
- Sánchez-Bayo, F. (2011a). Chapter 1 Sources and Toxicity of Pollutants, in *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 3–12.
- Sánchez-Bayo, F. (2011b). Chapter 4 Impacts of Agricultural Pesticides on Terrestrial Ecosystems, in *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 63–87. doi:10.2174/978160805121210063.
- Sánchez-Bayo, F. (2012). Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *J. Environ. Anal. Toxicol.* S4, 1–11. doi:10.4172/2161-0525.s4-002.
- Sánchez-Bayo, F., and Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS One* 9, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0094482.
- Schafer, R. B., van den Brink, P. J., and Liess, M. (2011). “Chapter 6 Impacts of Pesticides on Freshwater Ecosystems,” in *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*, 111–137. doi:10.2174/978160805121211101010111.
- Schmidt, K., and Podmore, I. (2015). Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *J. Biomarkers* 2015, 1–16. doi:10.1155/2015/981458.
- Schmidt, R., Cordovez, V., De Boer, W., Raaijmakers, J., and Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J.* 9, 2329–2335. doi:10.1038/ismej.2015.42.
- Schorkopf, D. L. P., Hrncir, M., Mateus, S., Zucchi, R., Schmidt, V. M., and Barth, F. G. (2009). Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: Further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *J. Exp. Biol.* 212, 1153–1162. doi:10.1242/jeb.021113.
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., and Garbeva, P. (2017). Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Front. Microbiol.* 8, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.02484.
- Schulz, R., Bub, S., Petschick, L. L., Stehle, S., and Wolfram, J. (2021). Applied pesticide toxicity shifts toward plants and invertebrates, even in GM crops. *Science*. 372, 81–84. doi:10.1126/science.abe1148.
- Schulz, S., and Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Nat.*

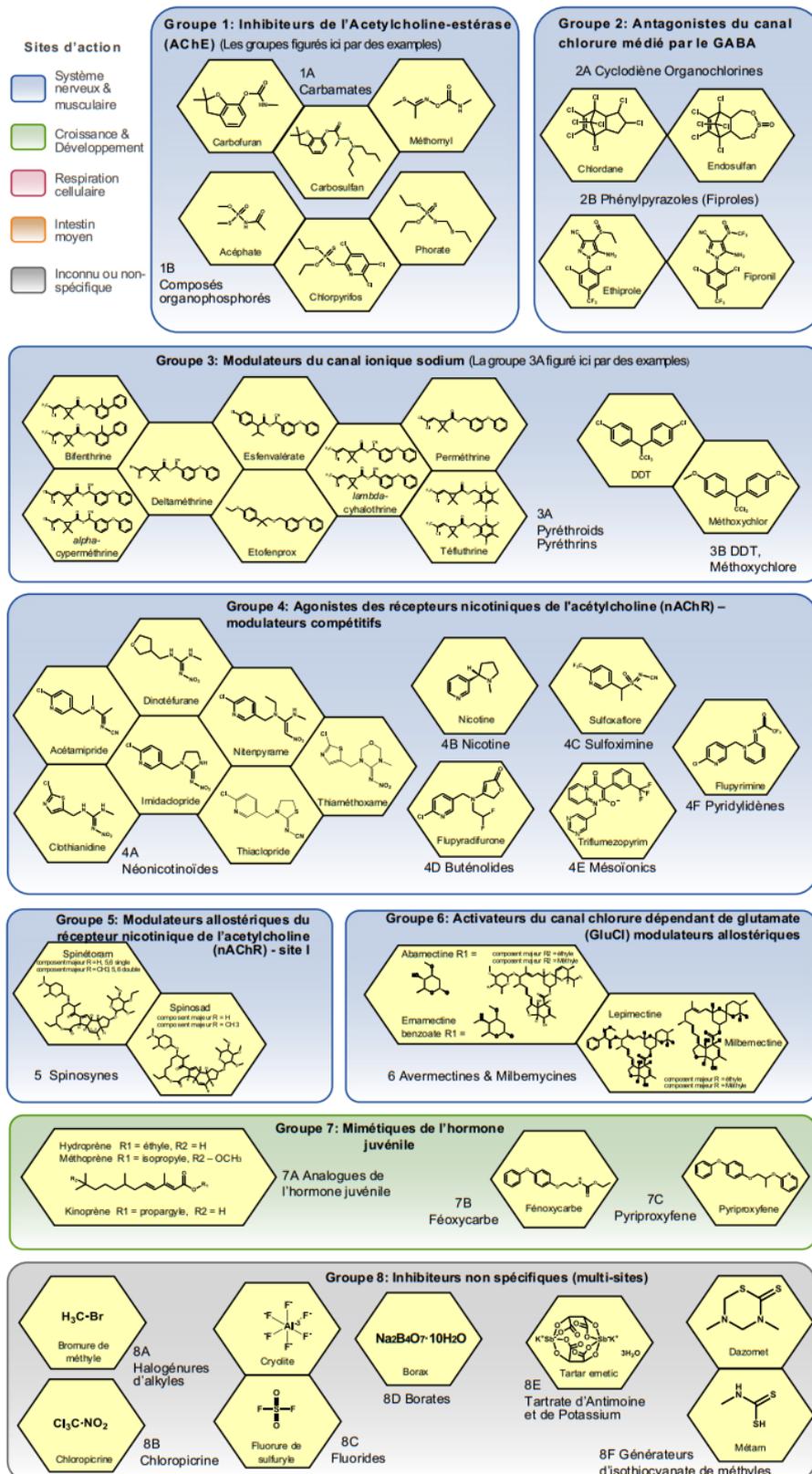
- Prod. Rep.* 24, 814–842. doi:10.1039/b507392h.
- Selvaraj, V., and Stocco, D. M. (2015). The changing landscape in translocator protein (TSPO) function. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 341–348. doi:10.1016/j.tem.2015.02.007.
- Senicourt, L. (2016). Etudes des protéines membranaires TSPO. Université Paris 6. Paris. <https://theses.hal.science/tel-01469143/>
- Sethi, S., Mathur, N., and Bhatnagar, P. (2013a). Growth response of microbial population exposed to synthetic pyrethroids. *Int. J. Environ. Sci.* 4, 42–53. doi:10.6088/ijes.2013040100005.
- Sethi, S., Nanda, R., and Chakraborty, T. (2013b). Clinical application of volatile organic compound analysis for detecting infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 462–475. doi:10.1128/CMR.00020-13.
- Shahid, M., and Khan, M. S. (2022). Ecotoxicological implications of residual pesticides to beneficial soil bacteria: A review. *Pestic. Biochem. Physiol.* 188, 1–20. doi:10.1016/j.pestbp.2022.105272.
- Sharma, A., Kumar, V., Kaur Kohli, S., Kaur, R., Kaur, T., Arora, S., *et al.* (2020). 3 Pesticide metabolism in plants, insects, soil microbes and fishes: an overview, in *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*, 1–292. doi:10.1002/9781119432241.
- Shepard, J. L., Olsson, B., Tedengren, M., and Bradley, B. P. (2000). Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* 50, 337–340. doi:10.1016/S0141-1136(00)00065-9.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., *et al.* (2015). Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34. doi:10.1007/s11356-014-3470-y.
- Sirami, C., Jeab-Pierre, T., and Julie, R. (2016). Services écosystémiques dans les agroécosystèmes. *Dict. d'agroécologie*.
- Smith, L. L. (2001). Key challenges for toxicologists in the 21st century. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 281–285. doi:10.1016/S0165-6147(00)01714-4.
- Soderlund, D. M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. *Arch. Toxicol.* 86, 165–181. doi:10.1007/s00204-011-0726-x.
- Sohrbi, M., Zhang, L., Zhang, K., Ahmetagic, A., and Wei, M. Q. (2014). Volatile organic compounds as novel markers for the detection of bacterial infections. *Clin. Microbiol. Open Access* 3, 1–6. doi:10.4172/2327-5073.1000151.
- Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., and Namieśnik, J. (2013). Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique. *Chem. Rev.* 113, 1667–1685. doi:10.1021/cr300148j.
- Tang, F. H. M., Lenzen, M., McBratney, A., and Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat. Geosci.* 14, 206–210. doi:10.1038/s41561-021-00712-5.
- Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., *et al.* (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere* 191, 990–1007. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.115.

- Tengö, J., Bergström, G., Borg-Karlson, B., Groth, I., and Francke, W. (1982). Volatile compounds from cephalic secretions of females in two cleptoparasite bee genera, *Epeolus* (Hym., anthophoridae) and *Coelioxys* (Hym., megachilidae). *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 37, 376–380. doi:10.1515/znc-1982-5-605.
- Thatheyus, A. J., and Gnana Selvam, A. D. (2013). Synthetic pyrethroids: Toxicity and biodegradation. *Appl. Ecol. Environ. Sci.* 1, 33–36. doi:10.12691/aees-1-3-2.
- Thorn, R. M. S., Reynolds, D. M., and Greenman, J. (2011). Multivariate analysis of bacterial volatile compound profiles for discrimination between selected species and strains *in vitro*. *J. Microbiol. Methods* 84, 258–264. doi:10.1016/j.mimet.2010.12.001.
- Toor, M. D., and Adnan, M. (2020). Role of soil microbes in agriculture; A review. *Biog. Sci. Res.* 4, 1–5. doi:10.46718/JBGSR.2020.04.000091.
- Tsuji, R., Yamada, N., and Kawamura, S. (2012). Mammal toxicology of synthetic pyrethroids, in *Pyrethroids from Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide* (Topics in Current Chemistry).
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., and Garbeva, P. (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol.* 25, 280–292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002.
- Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6.
- Van Straalen, N. M. (2003). Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ. Sci. Technol.*, 325–330. Available at: <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., *et al.* (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* 33, 378–455. doi:10.1210/er.2011-1050.
- VanEerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., Eerd, L. L. Van, Zablotowicz, R. M., and Hall, J. C. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* 51, 472–495.
- VanEngelsdorp, D., and Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80–S95. doi:10.1016/j.jip.2009.06.011.
- Vanhee, C., and Batoko, H. (2011). Arabidopsis TSPO and porphyrins metabolism a transient signaling connection? *Plant Signal. Behav.* 6, 1383–1385. doi:10.4161/psb.6.9.16477.
- Vanhee, C., Guillon, S., Masquelier, D., Degand, H., Deleu, M., Morsomme, P., *et al.* (2011a). A TSPO-related protein localizes to the early secretory pathway in *Arabidopsis*, but is targeted to mitochondria when expressed in yeast. *J. Exp. Bot.* 62, 497–508. doi:10.1093/jxb/erq283.
- Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M., and Batoko, H. (2011b). The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell Plant Cell* 23, 785–805. doi:10.1105/tpc.110.081570.

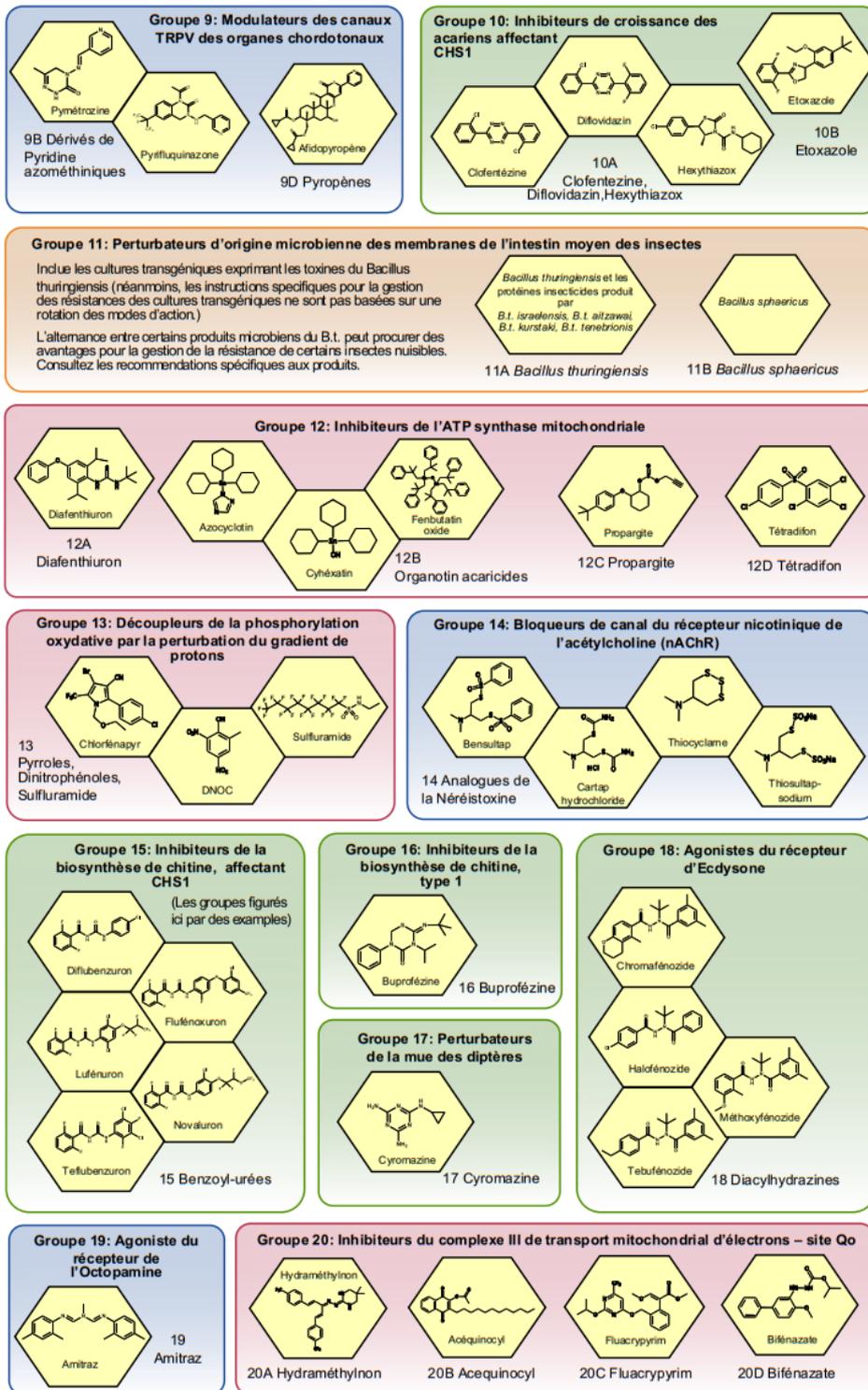
- Veenman, L., Vainshtein, A., Yasin, N., Azrad, M., and Gavish, M. (2016). Tetrapyrroles as endogenous TSP0 ligands in eukaryotes and prokaryotes: Comparisons with synthetic ligands. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–26. doi:10.3390/ijms17060880.
- Verschoye, R. D., and Aldridge, W. N. (1980). Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch. Toxicol.* 45, 325–329. doi:10.1007/BF00293813.
- Veselova, M. A., Plyuta, V. A., and Khmel, I. A. (2019). Volatile compounds of bacterial origin: Structure, biosynthesis, and biological activity. *Microbiology* 88, 261–274. doi:10.1134/S0026261719030160.
- Walia, A., Mehta, P., Guleria, S., Chauhan, A., and Shirkot, C. K. (2014). Impact of fungicide mancozeb at different application rates on soil microbial populations, soil biological processes, and enzyme activities in soil. *Sci. World J.* 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/702909.
- Walsh, U. F., Morrissey, J. P., and O’Gara, F. (2001). *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 289–295. doi:10.1016/S0958-1669(00)00212-3.
- Wang, X., Martínez, M. A., Wu, Q., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M. R., Anadón, A., *et al.* (2016). Fipronil insecticide toxicology: oxidative stress and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 46, 876–899. doi:10.1080/10408444.2016.1223014.
- Wang, Y., and Griffiths, W. J. (2007). Chapter 1: Mass spectrometry for metabolite identification, in *Metabolomics, metabonomics and metabolites profiling*, 1–43. doi:10.1039/9781847558107-00001.
- Waters, M. D., and Fostel, J. M. (2004). Toxicogenomics and systems toxicology: Aims and prospects. *Nat. Rev. Genet.* 5, 936–948. doi:10.1038/nrg1493.
- Weisskopf, L., Schulz, S., and Garbeva, P. (2021). Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 391–404. doi:10.1038/s41579-020-00508-1.
- Williams, I. H., Pickett, J. A., and Martin, A. P. (1981). Nasonov pheromon of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). Part II. Bioassay of the components using foragers. *J. Chem. Ecol.* 7, 225–237. doi:10.1007/BF00995745.
- Wilpiseski, R. L., Aufrecht, J. A., Retterer, S. T., Sullivan, M. B., Graham, D. E., Pierce, E. M., *et al.* (2019). Soil aggregate microbial communities: Towards understanding microbiome interactions at biologically relevant scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 85, 1–18. doi:10.1128/AEM.00324-19.
- Wolken, W. A. M., Ten Have, R., and Van Der Werf, M. J. (2000). Amino acid-catalyzed conversion of citral: cis-trans Isomerization and its conversion into 6-methyl-5-hepten-2-one and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5401–5405. doi:10.1021/jf0007378.
- Yeliseev, A. A., and Kaplan, S. (1995). A sensory transducer homologous to the mammalian peripheral-type benzodiazepine receptor regulates photosynthetic membrane complex formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* 270, 21167–21175. doi:10.1074/jbc.270.36.21167.
- Yeliseev, A. A., and Kaplan, S. (1999). A novel mechanism for the regulation of photosynthesis gene expression by the TspO outer membrane protein of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Biol. Chem.* 274, 21234–21243. doi:10.1074/jbc.274.30.21234.

- Yeliseev, A. A., and Kaplan, S. (2000). TspO of *Rhodobacter sphaeroides*. A structural and functional model for the mammalian peripheral benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 5657–5667. doi:10.1074/jbc.275.8.5657.
- Yeliseev, A. A., Krueger, K. E., and Kaplan, S. (1997). A mammalian mitochondrial drug receptor functions as a bacterial “oxygen” sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5101–5106. doi:10.1073/pnas.94.10.5101.
- Yin, G., Zhang, Y., Fu, M., Hua, S. S. T., Huang, Q., Pennerman, K. K., *et al.* (2019). Influence of R and S enantiomers of 1-octen-3-ol on gene expression of *Penicillium chrysogenum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 46, 977–991. doi:10.1007/s10295-019-02168-4.
- Zaluski, R., Bittarello, A. C., Vieira, J. C. S., Braga, C. P., Padilha, P. de M., Fernandes, M. da S., *et al.* (2020). Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. *Sci. Rep.* 10, 1–11. doi:10.1038/s41598-020-63289-w.
- Zaluski, R., Justulin, L. A., and Orsi, R. D. O. (2017). Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 7, 1–10. doi:10.1038/s41598-017-15581-5.
- Zaluski, R., Kadri, S. M., Alonso, D. P., Martins Ribolla, P. E., and de Oliveira Orsi, R. (2015). Fipronil promotes motor and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) and affects the development of colonies exposed to sublethal doses. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1062–1069. doi:10.1002/etc.2889.
- Zeng, X., and Kaplan, S. (2001). TspO as a modulator of the repressor/antirepressor (PpsR/AppA) regulatory system in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J. Bacteriol.* 183, 6355–6364. doi:10.1128/JB.183.21.6355-6364.2001.
- Zhang, X., Zhang, J., Wang, Y., Xu, D., Fan, X., Zhang, Y., *et al.* (2021). The oxylipin messenger 1-octen-3-ol induced rapid responses in kelp *Macrocystis pyrifera*. *Physiol. Plant.* 172, 1641–1652. doi:https://doi.org/10.1111/ppl.13358.
- Zhou, Z., Wu, X., Lin, Z., Pang, S., Mishra, S., and Chen, S. (2021). Biodegradation of fipronil: current state of mechanisms of biodegradation and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 7695–7708. doi:10.1007/s00253-021-11605-3.
- Zhu, Q., Yang, Y., Zhong, Y., Lao, Z., O’Neill, P., Hong, D., *et al.* (2020). Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). *Chemosphere* 254, 126779. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126779.

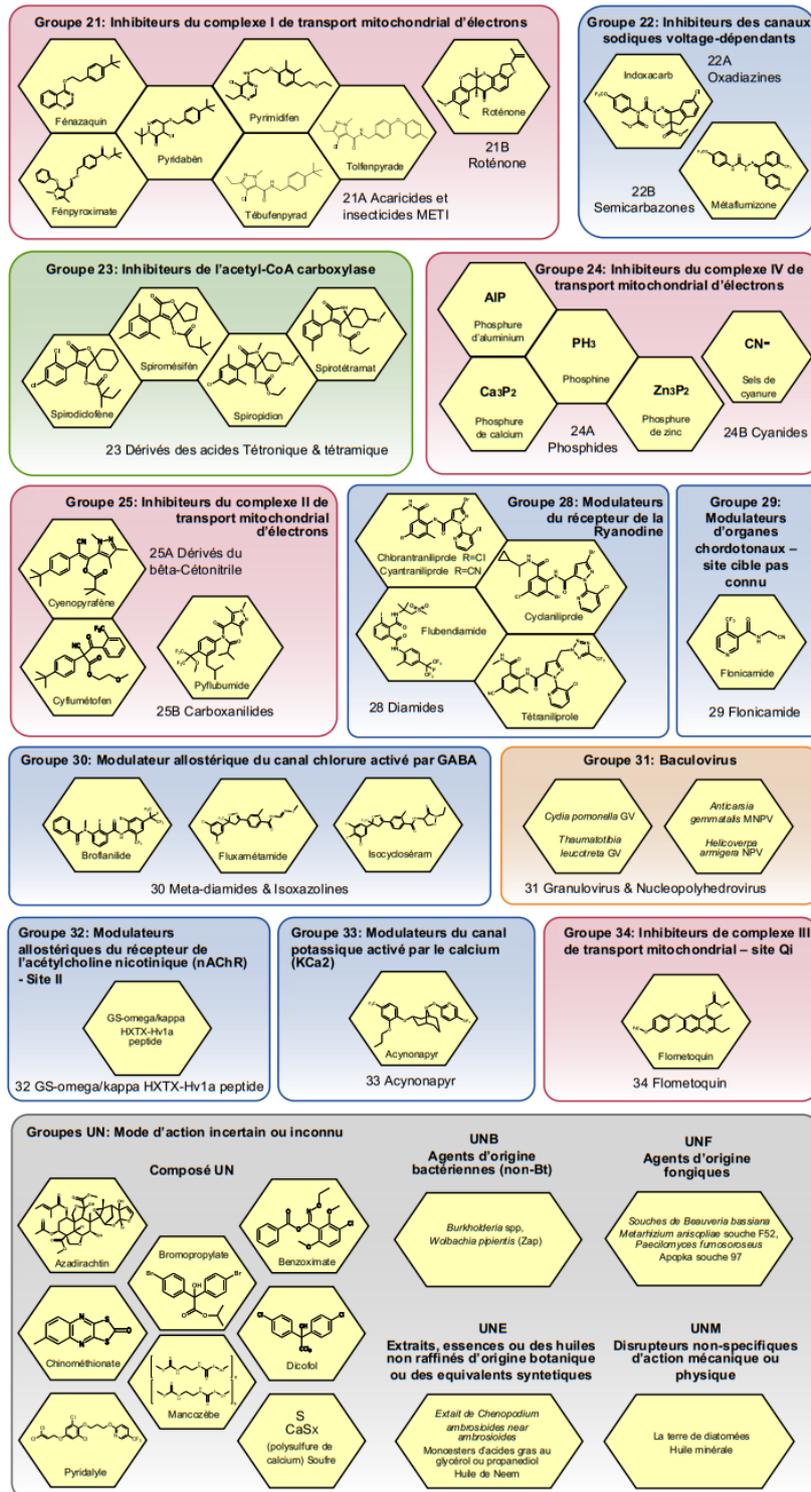
*Annexe n°1 Les insecticides et
leurs modes d'action*



Annexe 1. Les principaux groupes d'insecticides (poster réalisé par l'IRAC MoA Working Group en 2021, disponible en version numérique : <https://irac-online.org/documents/moa-structures-poster-french/?ext=pdf>). En bleu les insecticides neurotoxiques, en vert les régulateurs de croissance, en rouge les inhibiteurs de la respiration, en orange les perturbateurs de la fonction digestive et en gris les composés pour lesquels le mode d'action n'est pas encore défini.

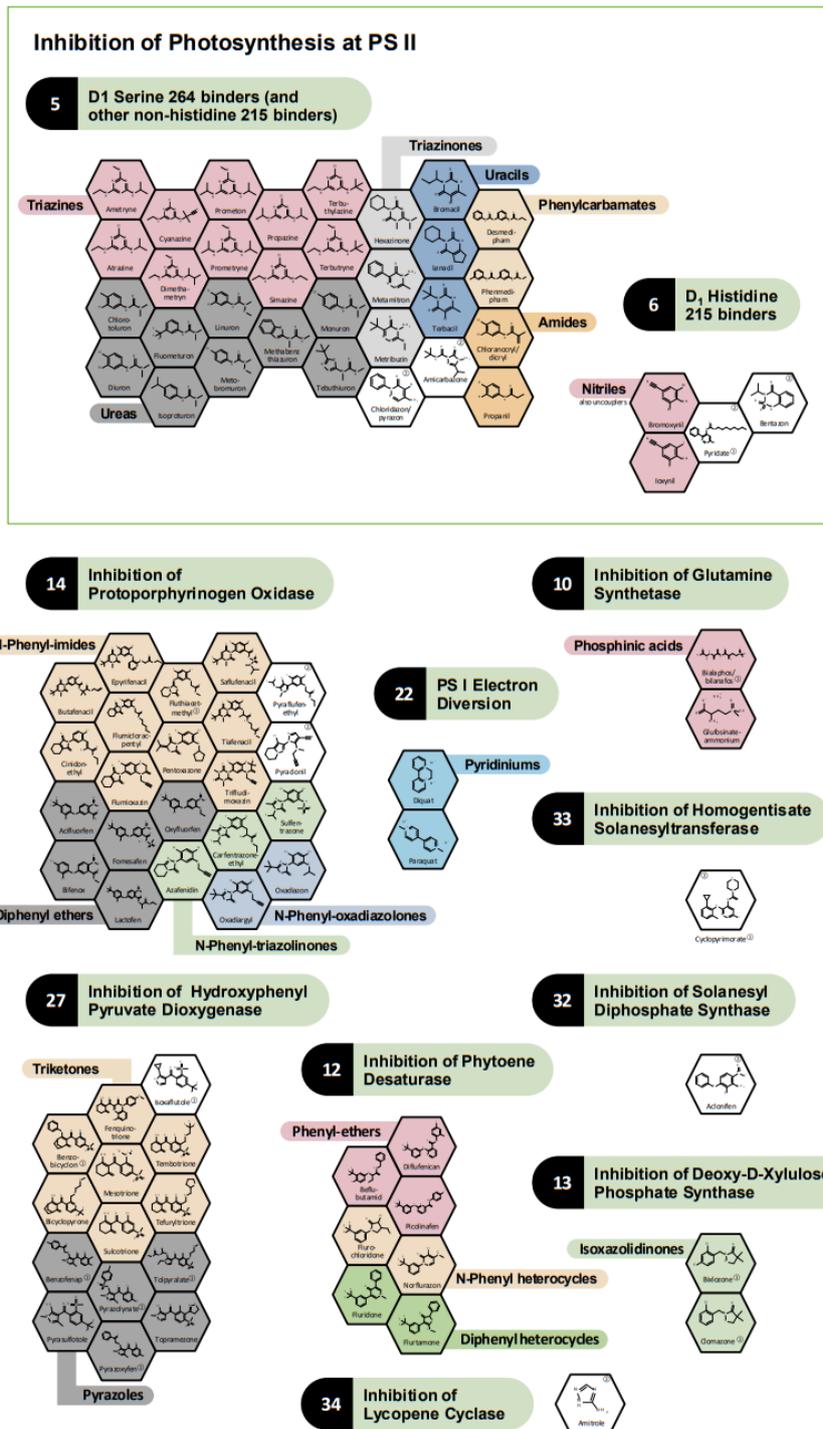


Annexe 1 (Suite).



Annexe 1 (Fin).

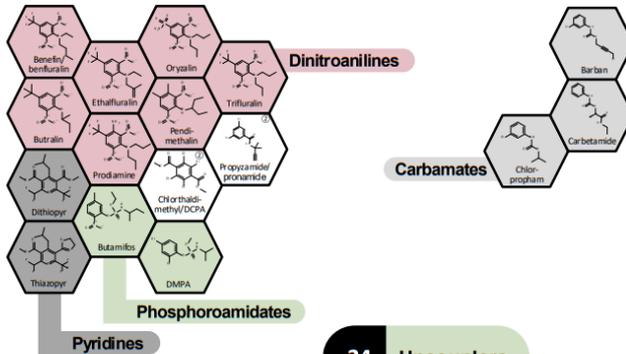
*Annexe n°2 Les herbicides et
leurs modes d'action*



Annexe 2. Les principaux groupes d'herbicides (poster réalisé par l'HRAC MoA Working Group en 2022, disponible en version numérique : https://hracglobal.com/files/HRAC_MOA_Poster_January_6_2022.pdf). Les ensembles 2, 9 et 10 sont les principaux groupes moléculaires impactant la biosynthèse des acides aminés, les ensembles 1, 15 et 30 sont les principaux groupes moléculaires impactant la biosynthèse des acides gras, les ensembles 5, 6 et 22 sont les principaux groupes moléculaires impactant la photosynthèse, les ensembles 12, 13, 14 et 27 sont les principaux groupes moléculaires impactant la biosynthèse des pigments, les ensembles 3, 23 et 29 sont les principaux groupes moléculaires impactant la division cellulaire et les ensembles 4, 18, 19 et 28 sont les principaux groupes moléculaires impactant la croissance. Les ensembles non indiqués ici correspondent à des ensembles mineurs s'intégrant dans les différents groupes d'herbicides définis.

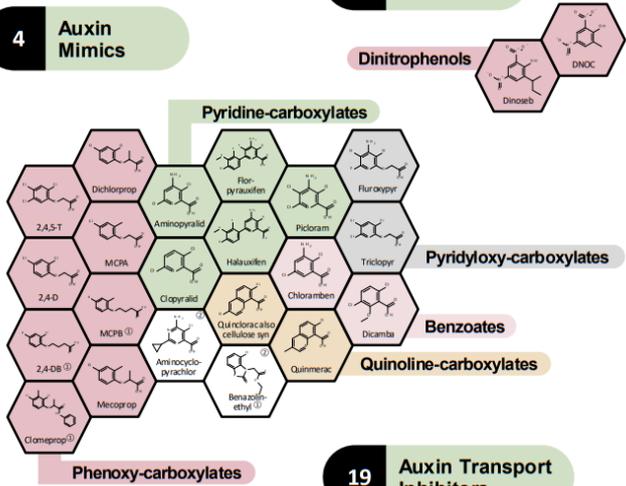
3 Inhibition of Microtubule Assembly

23 Inhibition of Microtubule Organization



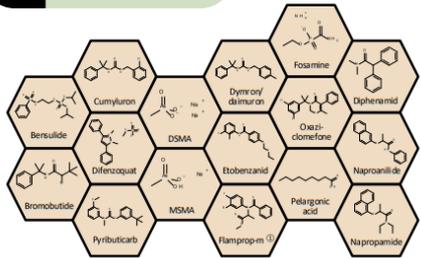
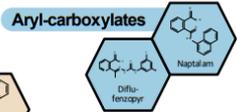
4 Auxin Mimics

24 Uncouplers



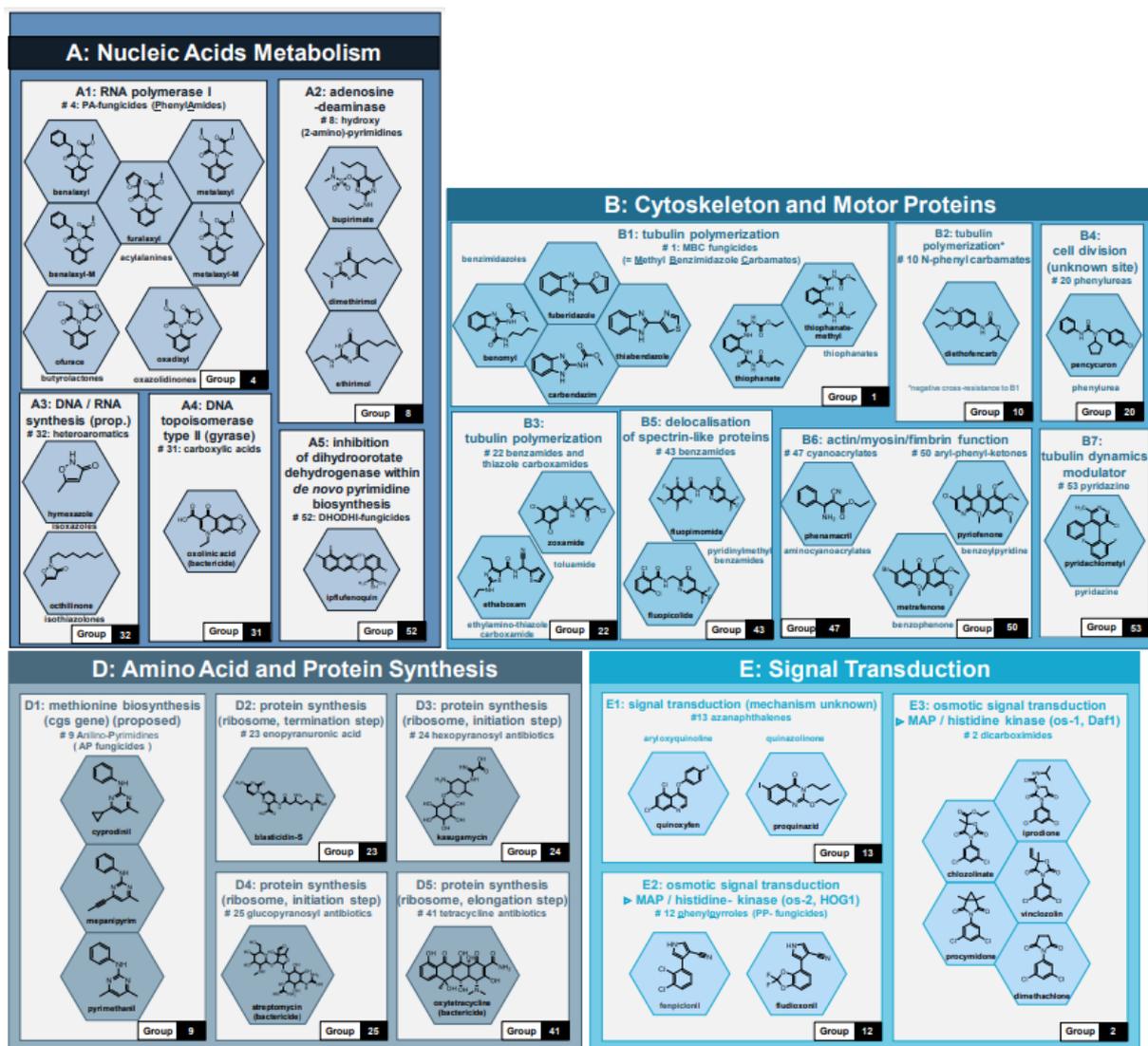
19 Auxin Transport Inhibitors

Ø Unknown Mode of Action



Annexe 2 (Fin).

*Annexe n°3 Les fongicides et
leurs modes d'action*



Annexe 3. Les principaux groupes de fongicides (poster réalisé par le FRAC MoA Working Group en 2022, disponible en version numérique : <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-mode-of-action-poster/frac-moa-poster-2022.pdf>). L'ensemble A est associé aux composés impactant le métabolisme des acides nucléique, l'ensemble B est associé à ceux impactant le cytosquelette, l'ensemble C est associé aux composés impactant la respiration cellulaire, l'ensemble D est associé à ceux impactant le métabolisme des protéines, l'ensemble E est associé aux composés impactant la transduction du signal, l'ensemble F est associé à ceux impactant le métabolisme des lipides, l'ensemble G est associé à ceux impactant le métabolisme des stérol, l'ensemble H est associé aux composés impactant la biosynthèse de la paroi cellulaire et l'ensemble I est associé à ceux impactant le métabolisme de la mélanine.

