

**Projet ANR-15-CE34-0004-01**

**MIXTRESS - Interactions between  
pathogens and pesticide mixtures in the  
honey bee**

Programme 2015 - 2020

<b>A</b>	<b>IDENTIFICATION</b> .....	<b>2</b>
<b>B</b>	<b>RESUME CONSOLIDE PUBLIC</b> .....	<b>2</b>
	B.1 Instructions pour les résumés consolidés publics .....	2
	B.2 Résumé consolidé public en français .....	3
	B.3 Résumé consolidé public en anglais.....	5
<b>C</b>	<b>MEMOIRE SCIENTIFIQUE</b> .....	<b>8</b>
	C.1 Résumé du mémoire .....	8
	C.2 Enjeux et problématique, état de l'art .....	8
	C.3 Approche scientifique et technique.....	9
	C.4 Résultats obtenus .....	9
	C.5 Exploitation des résultats .....	12
	C.6 Discussion .....	12
	C.7 Conclusions.....	12
	C.8 Références.....	12
<b>D</b>	<b>LISTE DES LIVRABLES</b> .....	<b>13</b>
<b>E</b>	<b>IMPACT DU PROJET</b> .....	<b>13</b>
	E.1 Indicateurs d'impact .....	13
	E.2 Liste des publications et communications .....	14
	E.3 Liste des éléments de valorisation.....	16
	E.4 Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires) .....	17

## A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	MIXTRESS ((Pesticide MIXTURES and pathogen STRESSORS in the bee)
Titre du projet	Interactions between pathogens and pesticide mixtures in the honey bee
Coordinateur du projet (société/organisme)	Luc BELZUNCES, INRAE
Période du projet (date de début – date de fin)	01/10/2015 – 30/09/2020 (étendue 30/06/2021)
Site web du projet, le cas échéant	Néant

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Monsieur Luc BELZUNCES
Téléphone	04 32 72 26 04 – 04 32 72 26 10 Secr.
Adresse électronique	luc.belzunces@inrae.fr
Date de rédaction	09/2021

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	Université e Clermont-Auvergne Responsable scientifique : Pr Frédéric Delbac frederic.delbac@uca.fr
---	---

## B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

### B.1 INSTRUCTIONS POUR LES RESUMES CONSOLIDES PUBLICS

*Les résumés publics en français et en anglais doivent être structurés de la façon suivante.*

*Titre d'accroche du projet (environ 80 caractères espaces compris)*

*Titre d'accroche, si possible percutant et concis, qui résume et explicite votre projet selon une logique grand public : il n'est pas nécessaire de présenter exhaustivement le projet mais il faut plutôt s'appuyer sur son aspect le plus marquant.*

*Les deux premiers paragraphes sont précédés d'un titre spécifique au projet rédigé par vos soins.*

*Titre 1 : situe l'objectif général du projet et sa problématique (150 caractères max espaces compris)*

*Paragraphe 1 : (environ 1200 caractères espaces compris)*

*Le paragraphe 1 précise les enjeux et objectifs du projet : indiquez le contexte, l'objectif général, les problèmes traités, les solutions recherchées, les perspectives et les retombées au niveau technique ou/et sociétal*

*Titre 2 : précise les méthodes ou technologies utilisées (150 caractères max espaces compris)*

*Paragraphe 2 : (environ 1200 caractères espaces compris)*

*Le paragraphe 2 indique comment les résultats attendus sont obtenus grâce à certaines méthodes ou/et technologies. Les technologies utilisées ou/et les méthodes permettant de surmonter les verrous sont explicitées (il faut éviter le jargon scientifique, les acronymes ou les abréviations).*

**Résultats majeurs du projet** (environ 600 caractères espaces compris)

Faits marquants diffusables en direction du grand public, expliciter les applications ou/et les usages rendus possibles, quelles sont les pistes de recherche ou/et de développement originales, éventuellement non prouvées au départ.

Préciser aussi toute autre retombée= partenariats internationaux, nouveaux débouchés, nouveaux contrats, start-up, synergies de recherche, pôles de compétitivités, etc.

**Production scientifique et brevets depuis le début du projet** (environ 500 caractères espaces compris)

Ne pas mettre une simple liste mais faire quelques commentaires. Vous pouvez aussi indiquer les actions de normalisation

**Illustration**

Une illustration avec un schéma, graphique ou photo et une brève légende. L'illustration doit être clairement lisible à une taille d'environ 6cm de large et 5cm de hauteur. Prévoir une résolution suffisante pour l'impression. Envoyer seulement des illustrations dont vous détenez les droits.

**Informations factuelles**

Rédiger une phrase précisant le type de projet (recherche industrielle, recherche fondamentale, développement expérimental, exploratoire, innovation, etc.), le coordonnateur, les partenaires, la date de démarrage effectif, la durée du projet, l'aide ANR et le coût global du projet, par exemple « Le projet XXX est un projet de recherche fondamentale coordonné par xxx. Il associe aussi xxx, ainsi que des laboratoires xxx et xxx). Le projet a commencé en juin 2006 et a duré 36 mois. Il a bénéficié d'une aide ANR de xxx € pour un coût global de l'ordre de xxx € »

## **B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS**

### **Toxicité des mélanges de pesticides à faibles doses**

#### **Les abeilles subissent une exposition à des mélanges de pesticides et des agents pathogènes**

Dans l'environnement, les abeilles subissent une multi-exposition à des agents pathogènes et des stressés chimiques dont les principaux sont les pesticides. Les interactions entre ces stressés peuvent aboutir à des effets synergiques dommageables pour les populations d'abeilles. Dans ce projet, il a été étudié les effets des mélanges de pesticides appartenant aux trois grandes classes (insecticides, fongicides et herbicides) et de produits phytopharmaceutiques contenant plusieurs pesticides. Pour coller à la réalité agro-environnementale, des abeilles, infectées ou non par l'agent pathogène *Nosema ceranae*, ont été exposées de façon chronique à une nourriture contaminée contenant des mélanges binaires ou ternaires de pesticides à des concentrations comprises entre 0.01 et 10 µg/L, ou de façon aiguë par pulvérisation à des niveaux d'exposition identiques ou inférieurs aux dosages homologués. Les effets des associations de stressés ont été étudiés focalisant l'attention sur la survie, la consommation alimentaire et la physiologie des individus. Ces études permettent de mieux comprendre les impacts des pesticides sur les abeilles et d'approcher la notion d'exposome.

#### **Une approche pluridisciplinaire pour évaluer les effets des associations de stressés chez l'abeille**

Les effets des associations de stressés ont été étudiés au moyen d'une méthodologie pluridisciplinaire. Dans un premier temps, les abeilles ont été exposées à des niveaux de doses ou de concentrations environnementaux. Les effets ont été recherchés en considérant la survie des individus et la consommation alimentaire, et en mettant en œuvre des approches biochimiques, transcriptomique, génomique, physiologique, microbiologique ainsi que de

chimie analytique. Il a ainsi été étudié les effets des associations de pesticides, chez des abeilles, infectées ou non par *Nosema Ceranae*, en considérant les impacts sur le métabolisme, le système nerveux, le système immunitaire, les défenses anti-oxydantes, le système de détoxification des xénobiotiques et le microbiote intestinal.

Cette approche pluridisciplinaire a été mise en œuvre afin de ne pas limiter les études à des savoir-faire déjà acquis et de développer une stratégie de recherche qui permet de pouvoir observer les différents types d'effets pouvant être induits par les stressés étudiés. Elle a aussi permis d'étudier la sensibilisation réciproque des abeilles, par un stressé, à un autre stressé.

### **Résultats majeurs du projet**

Les études sur les mélanges d'insecticide, de fongicide et d'herbicide montrent que (i) les mélanges binaires et ternaires sont toxiques pour les abeilles, (ii) la toxicité ne croît pas forcément avec la concentration et (iii) la toxicité ne croît pas systématiquement avec le nombre de substances.

Des modes d'actions spécifiques aux interactions entre insecticides et pathogène ont été mis en évidence, suggérant une inhibition de fonctions cellulaires essentielles chez l'abeille.

Enfin, tous ces facteurs de stress affectent l'ensemble de l'holobionte, c'est-à-dire l'abeille et son microbiote.

### **Production scientifique et brevets depuis le début du projet**

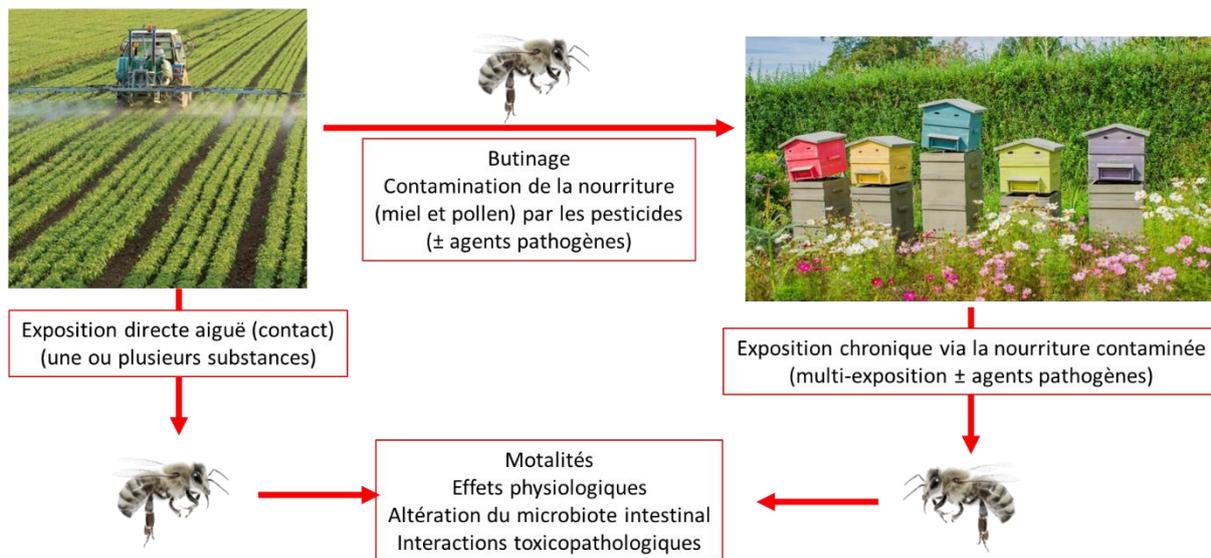
Toxicité systémique des mélanges : Almasri H *et al.* (2020) *Ecotoxicol Environ Saf* 203, 111013.

Toxicité des expositions séquentielles : Almasri H *et al.* (2021) *Ecotoxicol Environ Saf* 217, 112258.

Toxicité modulée par le statut toxicologique : Almasri *et al.* (2021) *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-021-13747-3

Toxicité des pesticides sur le microbiote : Blot *et al.* (2019) *PLoS ONE* 14, e0215466 ; Rouzé *et al.* (2019) *Microbes Environ* 34, 226.

## Illustration



En conditions agro-environnementales, les abeilles sont soumises à des pesticides, provenant de traitements phytopharmaceutiques, et au contact avec des agents pathogènes. Les abeilles peuvent subir soit une exposition aiguë aux pesticides, lors du traitement, ou des expositions chroniques, par consommation de nourriture contaminée provenant de la récolte de pollen et de nectar (avec lequel elles élaborent le miel). Si les expositions aiguës se produisent par contact simultané avec un nombre restreint de pesticides (de 1 à 3, généralement), les expositions chroniques se produisent par ingestion de nourriture contenant plusieurs pesticides. Dans les deux cas d'exposition, les effets induits portent sur la mortalité et des altérations physiologique pouvant fortement altérer l'intégrité des individus. Les pesticides et les agents pathogènes auxquels les abeilles sont en contact, peuvent interagir pour induire des effets synergiques fortement dommageables pour les individus et la colonie d'abeilles.

## Informations factuelles

Le projet de recherche MIXTRESS est un projet au caractère à la fois fondamental et appliqué. Il a été coordonné par Luc BELZUNCES de l'INRAE, Laboratoire de Toxicologie Environnementale (LTE) de l'Unité de Recherche Abeilles & Environnement. Il associe le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement de l'Université Clermont Auvergne. Le projet a commencé en Octobre 2015 et a duré 60 mois. Il a bénéficié d'un aide de l'ANR de 445 000 euros, pour un coût total de l'ordre de 1 758 232 euros.

## B.3 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS

### Toxicity of pesticides mixtures at low doses

#### Bees are exposed to mixtures of pesticides and pathogens

In the environment, bees undergo multiple exposures to pathogens and chemical stressors, the main ones being pesticides. Interactions between these stressors can lead to synergistic effects that are harmful to bee populations. In this project, the effects of mixtures of pesticides belonging to the three main classes (insecticides, fungicides and herbicides) and of phytopharmaceutical products containing several pesticides were studied. To reflect the agro-environmental reality, bees, infected or not by the pathogen *Nosema ceranae*, were exposed chronically to contaminated food containing binary or ternary mixtures of pesticides at

concentrations ranging from 0.01 to 10 µg/L, or acutely by spraying at exposure levels identical to the registered dosages, on lower. The effects of stressor combinations were studied with a focus on survival, food consumption and physiology of individuals. These studies allow a better understanding of the impacts of pesticides on bees and to approach the notion of exposome

### **A multidisciplinary approach to evaluate the effects of stressor combinations in bees**

The effects of stressor combinations were studied using a multidisciplinary methodology. First, bees were exposed to environmental dose or concentration levels. The effects were investigated by considering the survival of individuals and food consumption, and by implementing biochemical, transcriptomic, genomic, physiological, microbiological and analytical chemistry approaches. The effects of pesticide combinations were studied in bees, infected or not by *Nosema Ceranae*, considering the impacts on the metabolism, the nervous system, the immune system, the antioxidant defenses, the xenobiotic detoxification system and the intestinal microbiota.

This multidisciplinary approach was implemented in order not to limit the studies to already acquired know-how and to develop a research strategy that allows us to observe the different types of effects that can be induced by the studied stressors. It also allowed the study of the reciprocal sensitization of bees, by a stressor, to another stressor.

### **Major findings of the project**

Studies on insecticide, fungicide and herbicide mixtures show that (i) binary and ternary mixtures are toxic to bees, (ii) toxicity does not necessarily increase with concentration and (iii) toxicity does not systematically increase with the number of substances.

Mode of action that were specific insecticide-pathogen interactions were shown, suggesting inhibition of essential cellular functions in the honeybee.

Lastly, all stressors were shown to affect the whole honeybee holobiont, *i.e.* the insect and its microbiota.

### **Scientific production and patent since the beginning of the project**

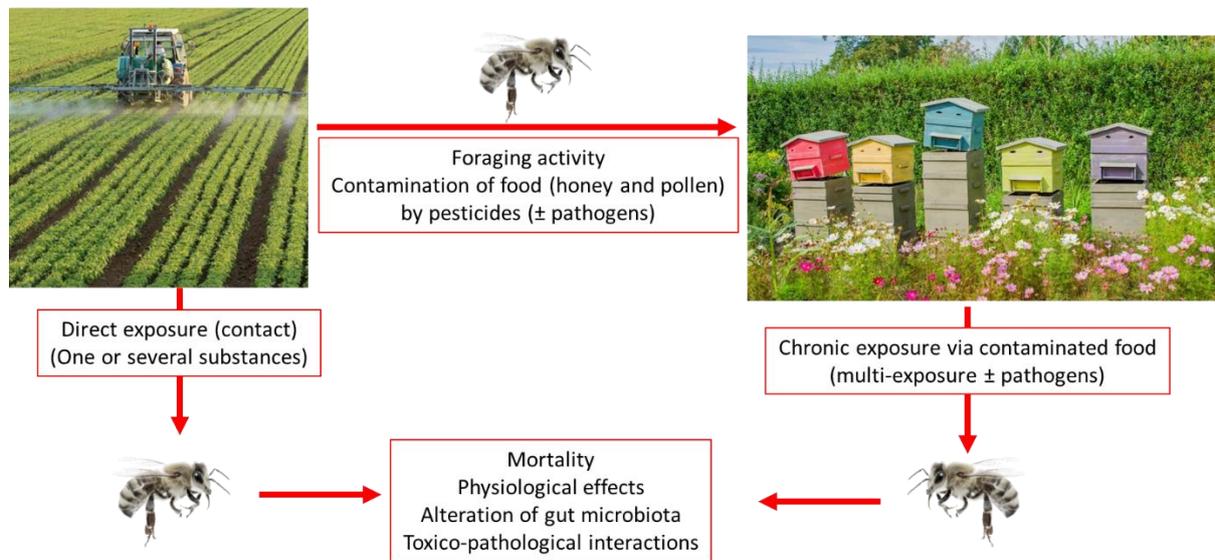
Systemic toxicity of mixtures : Almasri H et al. (2020) *Ecotoxicol Environ Saf* 203, 111013.

Toxicity of overlapping exposures : Almasri H al. (2021) *Ecotoxicol Environ Saf* 217, 112258.

Toxicity modulated by the toxicological status : Almasri et al (2021) *Environmental Science and Pollution Research*. DOI: 10.1007/s11356-021-13747-3

Toxicité of pesticides on the microbiota : Blot *et al.* (2019) *PLoS ONE* 14, e0215466 ; Rouzé *et al.* (2019) *Microbes Environ* 34, 226.

## Illustration



Under agro-environmental conditions, bees are subjected to pesticides, from phytopharmaceutical treatments, and to contact with pathogens. The bees can undergo either an acute exposure to pesticides, during crop treatment, or chronic exposures, by consumption of contaminated food coming from the harvest of pollen and nectar (with which they elaborate the honey). While acute exposures occur through simultaneous contact with a small number of pesticides (usually 1 to 3), chronic exposures occur through ingestion of food containing several pesticides. In both cases of exposure, the induced effects are mortality and physiological alterations that can strongly alter the integrity of the individuals. Pesticides and pathogens, to which bees come in contact, can interact to induce synergistic effects that are highly damaging to individuals and the bee colony.

## Factual information

The MIXTRESS research project is both fundamental and applied. It was coordinated by Luc BELZUNCES of INRAE, *Laboratoire de Toxicologie Environnementale* (LTE) of the Research Unit *Abeilles & Environnement*. It associates the *Microorganisms: Genome and Environment Laboratory* of the Clermont-Auvergne University. The project started in October 2015 and lasted 60 months. It received a grant from the ANR of 445 000 euros, for a total cost of 1 758 232 euros.

## C MEMOIRE SCIENTIFIQUE

**Mémoire scientifique confidentiel** : oui / ~~non~~

### C.1 RESUME DU MEMOIRE

Dans l'environnement, les abeilles subissent une multi-exposition à des agents pathogènes et des pesticides. Les interactions entre ces stressseurs peuvent aboutir à des effets synergiques dommageables. Ce projet a étudié les effets des mélanges de pesticides appartenant aux trois grandes classes (insecticides, fongicides et herbicides), à des doses environnementales, et de produits phytopharmaceutiques contenant plusieurs pesticides en association avec l'agent pathogène *Nosema ceranae*. Les effets des associations de stressseurs ont été étudiés au moyen d'une méthodologie pluridisciplinaire. Les effets ont été recherchés en considérant la survie des individus et leur consommation alimentaire, et en mettant en œuvre des approches biochimiques, transcriptomique, génomique, physiologique, microbiologique ainsi que de chimie analytique permettant d'étudier des impacts sur le métabolisme, le système nerveux, le système immunitaire, les défenses anti-oxydantes, le système de détoxification des xénobiotiques et le microbiote intestinal. Les études sur les mélanges d'insecticide, de fongicide et d'herbicide montrent que (i) les mélanges binaires et ternaires sont toxiques pour les abeilles, (ii) la toxicité ne croit pas forcément avec la concentration et (iii) la toxicité ne croit pas systématiquement avec le nombre de substances. De plus, les travaux sur les interactions entre les stressseurs biotiques et abiotiques montrent que les synergies entre l'agent pathogène *N. ceranae* et les mélanges de pesticides ne sont pas dues à une augmentation de la prolifération de l'agent pathogène.

### C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

Les populations d'abeilles domestiques sont soumises à un déclin constant depuis trois décennies. A l'heure actuelle, ce déclin est considéré comme un phénomène multifactoriel [1]. Parmi les facteurs potentiellement impliqués, les pesticides et les agents pathogènes semblent être les principaux contributeurs [2]. De plus, ce déclin peut être corrélé au développement, depuis 1980, de nouvelles familles d'insecticides très toxiques pour les abeilles, les pyréthrinoides, les néonicotinoïdes et les phénylpyrazoles [3, 4]. Il est démontré que les pesticides ont de forts impacts sur tous les écosystèmes et il ne serait pas compréhensible de considérer qu'ils n'affectent pas les abeilles, surtout lorsqu'il s'agit d'insecticides [5-7].

Lorsqu'ils sont associés, les pesticides et les agents pathogènes peuvent conduire à des interactions synergiques dommageables pour les colonies d'abeilles [8]. De plus, l'infection par *N. ceranae* sensibilise l'abeille à une nouvelle exposition sublétales aux insecticides fipronil et thiaclopride [9], ce qui conduit à un effet synergique létal. Cet effet est observé quelle que soit la séquence d'exposition aux facteurs de stress, ce qui suggère qu'un facteur de stress potentialise toujours l'effet de l'autre [10]. En outre, les interactions synergiques entre *Nosema* et les pesticides se produisent avec des pesticides appartenant à différentes familles chimiques [8-11]. Ceci suggère que des mécanismes d'action communs aux pesticides pourraient être à l'origine des interactions toxico-pathologiques négatives.

Malgré la présence de nombreux pesticides dans la nourriture et la cire des abeilles, les mélanges de pesticides sont très peu étudiés. Étant donné qu'un pesticide peut provoquer des interactions synergiques avec des agents pathogènes ou sensibiliser les abeilles à une action supplémentaire d'un agent pathogène, il est légitime de supposer qu'un mélange de pesticides puisse représenter un synergiste ou un sensibilisateur plus puissant [11, 12]. Cependant, les effets finaux des interactions pesticides-pathogènes sont impossibles à prévoir *a priori*, surtout si l'on considère qu'il existe une infinité de combinaisons possibles.

### C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Ce projet a porté sur les effets des mélanges de pesticides et les interactions entre les mélanges de pesticides et les agents pathogènes. Compte tenu de la grande diversité de pesticides observées dans les produits de la ruche, le choix s'est orienté sur des pesticides appartenant aux 3 classes majeures de substances actives, les insecticides, les fongicides et les herbicides (env. 98% du marché). Une attention particulière a été portée sur des substances fréquemment rencontrées dans les produits de la ruche : un insecticide néonicotinoïde, l'imidaclopride, un fongicide azole, le difénoconazole, et un herbicide, le glyphosate. Nous nous sommes aussi intéressés aux mélanges commerciaux de substances actives, c'est-à-dire les produits phytopharmaceutiques contenant plusieurs substances actives. L'attention a été portée sur le Proteus®, produit à base de deltaméthrine, un insecticide pyréthrianoïde, et de thiacloprid, un insecticide néonicotinoïde.

En ce qui concerne les agents pathogènes, nous nous sommes focalisés sur un agent émergent, *Nosema ceranae*. Il s'agit d'une microsporidie pour laquelle des interactions négatives avec différents pesticides ont déjà été démontrées. Ainsi, *N. ceranae* servira d'agent pathogène modèle pour comprendre les modes d'action des interactions pesticide-pathogène. Dans ce projet, nous n'avons pas étudié d'autres agents pathogènes car, compte tenu des nombreuses modalités d'exposition (nombre de substances, de mélanges, de concentrations) et de combinaisons pathogène/pesticides seuls et pathogène/mélanges de pesticides, les études auraient pris une ampleur exponentielle.

Les modalités d'exposition aux stressseurs ont été choisies selon plusieurs logiques :

- *N. ceranae* a été administrée individuellement par ingestion de 100 000 spores par abeille, car il a été démontré que cela pouvait induire la nosébose.
- Les mélanges de pesticides contenant les substances actives appartenant aux trois classes ont été administrés de façon chronique via la nourriture pour mimer une exposition orale via le miel contaminé. Les niveaux d'exposition supérieurs sont de l'ordre des concentrations observées dans le miel (10 µg/L, soit 8,13 µg/kg). Cependant, pour calquer avec la réalité agro-environnementale et pour étudier les effets des faibles doses, des niveaux d'exposition 10 fois, 100 fois et 1000 fois inférieurs ont été aussi étudiés.
- Le Proteus® étant un produit phytopharmaceutique épandu par pulvérisation, les abeilles ont été exposées par pulvérisation au moyen d'une Tour de Potter au dosage homologué et à des dosages inférieurs pour mimer une exposition par dérive.

Pour évaluer les impacts des mélanges de pesticides et des associations entre les pesticides, seuls ou en mélanges, et *Nosema ceranae*, il a été mis en œuvre une stratégie d'étude permettant d'observer les effets induits à différentes échelles d'organisation. Aussi, les effets observés ont porté sur la survie des individus, la consommation alimentaire, les perturbations physiologiques affectant le système immunitaire, le système nerveux, le métabolisme, les processus de détoxication, l'expression génique et le microbiote intestinal.

Ainsi, le décryptage des mécanismes expliquant les effets négatifs des synergies pathogène-pesticide sur la santé des abeilles est non seulement pertinent mais aussi d'une grande importance pour prévenir les pertes de colonies.

### C.4 RESULTATS OBTENUS

#### Tâche 1. Interaction entre *Nosema ceranae* et les mélanges de pesticides

##### Task 1.1 Assessment of sublethal doses (acute exposure experiments)

Les études d'exposition aiguë aux mélanges de pesticides ont été conduites en choisissant comme modèle un produit commercial, le Proteus® qui contient un insecticide pyréthrianoïde, la deltaméthrine, et un insecticide néonicotinoïde, le thiacloprid. L'exposition des abeilles a été

effectuée par pulvérisation au moyen d'une tour de Potter pour mimer les expositions en plein champ. La toxicité de contact du Proteus® n'étant pas connue, les abeilles ont été exposées à la dose homologuée par hectare et à des fractions de la dose homologuée.

### Tâche 1.2. Etude d'exposition aiguë

Des abeilles ont été infectées ou non par *N. ceranae* puis exposées par contact au Proteus® ainsi qu'à des formulations contenant les substances actives deltaméthrine (Decis®) ou thiacloprid (Calypso®), seules ou combinées. L'étude a donné plusieurs résultats (Rouzé et al., 2021) :

- Le jour suivant l'exposition au Proteus®, son impact sur la mortalité est dose-dépendant avec une plus grande susceptibilité des abeilles infectées, les deux facteurs de stress montrant un effet synergique.
- A plus long terme, c'est l'infection qui impacte principalement la mortalité, sans effet synergique avec le Proteus®, qui n'a pas facilité le succès parasitaire.
- La combinaison des formulations simples Decis®+Calypso® a un effet synergique sur la mortalité aux doses équivalentes au Proteus®.
- Les approches moléculaires montrent un effet distant du Proteus® sur l'intestin de l'abeille et son microbiote, bien qu'étant appliqué par contact à la surface de l'insecte.
- L'impact du Proteus® et de *N. ceranae* sur le transcriptome est plus intense lorsqu'ils sont combinés, avec un impact spécifique sur le système ubiquitine-protéasome et sur la phosphorylation oxydative.

### Tâche 1.3. Etude d'exposition chronique

Les études sur les expositions chroniques des abeilles, infectées ou non par *Nosema*, à l'imidaclopride, au difénoconazole et au glyphosate ont révélé plusieurs faits marquants :

- Les mélanges binaires et ternaires sont toxiques pour les abeilles (Almasri et al, 2020).
- Les mélanges sont aussi bien toxiques chez les abeilles d'été que chez les abeilles d'hiver (Almasri et al. 2020 ; Pal et al. 2021)
- La toxicité des mélanges de pesticides n'est pas forcément corrélée au niveau d'exposition ni au nombre de substances des mélanges. Par exemple, chez les abeilles d'hiver, toxicité les moins élevées ont été observées à la concentration la plus faible et à la concentration la plus forte (Pal et al., 2021).
- Les interactions ne sont pas toujours synergiques mais peuvent aussi conduire à des antagonismes (diminution de la toxicité) (Almasri et al. 2020 ; Pal et al. 2021).
- L'infection par *Nosema* est un facteur aggravant dans les interactions entre les pesticides (Almasri et al. 2021a).
- Les synergies observées entre les pesticides et *Nosema* ne sont pas dues à une augmentation de la prolifération de l'agent pathogène (Almasri et al., 2021a).
- Les expositions simultanées à plusieurs pesticides peuvent conduire à des synergies létales. Cependant, les expositions chevauchantes, mais non les séquentielles, peuvent aussi induire des synergies (Almasri et al., 2021a) entre pesticides, et entre les mélanges de pesticides et *N. ceranae*.
- Le statut toxicologique des abeilles influence fortement les effets d'un toxique (Almasri et al., 2021b). L'exposition préalable des abeilles à l'herbicide glyphosate augmente la toxicité d'une exposition ultérieure au fongicide difénoconazole alors qu'une exposition à l'insecticide imidaclopride la diminue. Cependant, une exposition préalable au mélange glyphosate-imidaclopride ne modifie pas la toxicité du fongicide alors que le nombre de substances auxquelles les abeilles sont exposées augmente (Almasri et al. 2021b).

- L'imidaclopride, le glyphosate et le difénoconazole, seuls ou en mélange ternaire, n'affectent pas l'installation du microbiote intestinale chez les abeilles naissantes. Seuls quelques effets négatifs ont été observés chez un nombre limité d'espèces bactériennes transitoires n'appartenant pas au cœur du microbiote (Almasri et al. 2021c).

#### **Task 1.4. à 1.6. Analyses de biologie moléculaire et cellulaire, transcriptomique**

Une partie des résultats sur les analyses moléculaires (biochimique, biologie moléculaire et transcriptomique) sera décrit dans la Task 2. Néanmoins, les analyses moléculaires ont montré certaines grandes caractéristiques de l'action des mélanges de pesticides et des interactions entre les mélanges de pesticides et le pathogène *N. ceranae* :

- Lors d'une exposition chronique orale, bien que le tube digestif soit le site primaire d'exposition, les mélanges binaires ou ternaires d'imidaclopride (insecticide), de difénoconazole (fongicide) et de glyphosate (herbicide) induisent une toxicité par action systémique, sans toxicité préférentielle pour certain tissu (Almasri et al., 2020).
- Les mélanges de pesticides induisent de fortes perturbations métaboliques, même sur des systèmes qui n'ont pas de relation directe avec les modes d'action des substances actives (Almasri et al., 2020, 2021a, 2021b, 2021c ; Pal et al., 2021).
- Les synergies entre les mélanges de pesticides et *Nosema* ne sont pas dues à une prolifération de l'agent pathogène (Almasri et al. 2021a)

#### **Task 2. Modes d'action des interactions Nosema-pesticides**

- Les mélanges de pesticides induisent de fortes perturbations physiologiques qui affectent le métabolisme, l'immunité, les mécanismes de détoxification, le système nerveux et les ressources énergétiques (Almasri et al. 2020, 2021abc).
- Une exposition chronique à un pesticide seul, comme l'imidacloprid ou le glyphosate, une exposition aiguë par contact au Proteus®, ou une infection à *Nosema*, peut perturber le microbiote intestinal des abeilles adultes (Blot et al., 2019 ; Rouzé et al., 2019). Toutefois, les mélanges de pesticides ou les combinaisons pesticide-*Nosema* ne semblent pas potentialiser ces impacts (Blot et al., 2019 ; Almasri et al. 2021c).
- Les mélanges de pesticides induisent un très fort stress oxydant qui pourrait participer à leur toxicité et représenter un mode d'action commun (Pal et al. 2021).
- Selon les niveaux d'exposition, les mécanismes de la toxicité des mélanges de pesticides varient et, à doses ou concentrations faibles, ne sont pas liés à leur mode d'action primaire.
- Les synergies observées entre *Nosema* et les mélanges de pesticides ne sont pas dues à une prolifération de l'agent pathogène.
- *Nosema* et les mélanges de pesticides affectent cependant de manière spécifique certaines fonctions de l'intestin moyen telles que le système ubiquitine-protéasome, responsable du turnover des protéines malformées, et la phosphorylation oxydative, suggérant une inhibition de la respiration cellulaire (Rouzé et al., *in prep*).

#### **Task 3. Interactions Nosema pesticides en conditions semi-contrôlées (semi-champ)**

Les études en conditions semi-contrôlées prévues les années 2 et 3 n'ont pas pu être conduites car les printemps 2017 et 2018 ont été marqués par une pluviométrie particulièrement importante qui s'est prolongée jusqu'au 15 Juin de chaque année. Ces périodes ont donc été mises à profit pour entreprendre de nouvelles études de laboratoire : (i) Influence du statut toxicologique sur la toxicité des pesticides et (ii) Effets des expositions séquentielles et chevauchantes aux pesticides et à *Nosema*. Ces études ont fait l'objet de 2 publications.

## C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS

Dans un premier temps, les résultats sont publiés en journaux internationaux (Almasri et al. 2020, 2021abc ; Pal et al. 2021 ; Blot et al., 2019 ; Rouzé et al. 2019) en faisant référence au soutien de l'ANR, et sont diffusés dans des colloques internationaux (Almasri et al. 2018, 2019 ; Tavares et al. 2018 ; Rouzé et al., 2019). Dans un deuxième temps, les résultats sont diffusés dans des articles de transfert (en cours) et dans des conférences pour le milieu apicole et les instances concernées par l'homologation des pesticides et l'évaluation du risque lié aux pesticides (voir E.2. Liste des publications et communication).

## C.6 DISCUSSION

Les objectifs visés dans le projet initial ont pu être réalisés. Seules les études en conditions semi-contrôlées n'ont pas pu être conduites la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> année à cause d'une forte pluviométrie au cours du printemps. Aussi, le temps disponible a été mis à profit pour conduire des études complémentaires sur les mélanges de pesticides et les interactions entre les mélanges de pesticide et le pathogène *N. ceranae* : (i) influence du statut toxicologique des abeilles sur la toxicité des pesticides, (ii) effets des expositions séquentielles et chevauchantes aux pesticides et à *Nosema* (Almasri et al. 2021a ; Almasri et al. 2021b). Les perspectives ouvertes par le projet portent sur le comportement imprévisible des mélanges de pesticides avec des effets antagonistes possibles et une toxicité qui n'est pas systématiquement corrélée au niveau d'exposition et au nombre de substances des mélanges. Ces résultats sont très importants car, à l'heure où l'exposome prend un place de plus en plus importante en toxicologie, les résultats des procédures d'évaluation du risque pourraient être fortement affectés par le comportement non prévisible des mélanges des pesticides et par les effets délétères des associations de stressseurs biotiques (agents pathogènes) et abiotiques (pesticides, substances chimiques en général) qui se produisent à bas bruits, c'est-à-dire à des niveaux où les stressseurs n'induisent pas d'effet lorsqu'il sont seuls.

## C.7 CONCLUSIONS

Les études conduites dans le cadre du projet MIXTRESS ont permis de montrer que les mélanges de pesticides, et les interactions entre les mélanges de pesticides et un agent pathogène, pouvaient induire des effets pas toujours prévisibles avec des fortes toxicités, des antagonismes, une toxicité pas forcément corrélée au niveau d'exposition et au nombre de substances des mélanges. Dans tous les cas, la présence du pathogène constitue un effet aggravant de l'action des mélanges de pesticides. Ces études montrent qu'il est difficile d'évaluer le risque présenté par les mélanges de pesticides et les interactions toxico-pathologiques et qu'il conviendra d'accorder, dans le futur, une attention particulière à la caractérisation la plus exhaustive possible de l'exposome.

## C.8 REFERENCES

1. Moritz, R.F.A., et al.. *Apidologie*, 2010. **41**(3): p. 227-242.
2. vanEngelsdorp, D. and M.D. Meixner. *J Invertebr Pathol*, 2010. **103**(Supplement 1): p. S80-S95.
3. Suchail, S., D. Guez, and L.P. Belzunces. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001. **20**(11): p. 2482-2486.
4. Bonmatin, J.M., et al.. *Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems*, ed. E.S.J.R.D. Lichtfouse. 2005. 483-494.
5. Desneux, N., A. Decourtye, and J.-M. Delpuech. *Ann Rev Entomol*, 2007. **52**: p. 81-106.
6. Belzunces, L.P., S. Tchamitchian, and J.-L. Brunet. *Apidologie*, 2012. **43**(3): p. 348-370.
7. van der Sluijs, J.P., et al.. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2013. **5**(3-4): p. 293-305.
8. Alaux, C., et al.. *Environmental Microbiology*, 2010. **12**(3): p. 774-782.
9. Vidau, C., et al.. *Plos One*, 2011. **6**(6).
10. Aufauvre, J., et al.. *Sci Rep*, 2012. **2**(326): p. srep00326-srep00326.
11. Wu, J.Y., et al.. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012. **109**(3): p. 326-329.
12. Pettis, J.S., et al.. *PLoS ONE*, 2013. **8**(7): p. e70182.

## D LISTE DES LIVRABLES

Rubrique sans objet pour le programme MIXTRESS

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
	1				

## E IMPACT DU PROJET

### E.1 INDICATEURS D'IMPACT

*Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)*

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
International	Revue à comité de lecture	4	4
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)	1	3
France	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)	1	7
Actions de diffusion	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation		5
	Autres		

## **Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)**

Rubrique sans objet pour le projet MIXTRESS

	<b>Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)</b>
<b>Brevets internationaux obtenus</b>	
<b>Brevet internationaux en cours d'obtention</b>	
<b>Brevets nationaux obtenus</b>	
<b>Brevet nationaux en cours d'obtention</b>	
<b>Licences d'exploitation (obtention / cession)</b>	
<b>Créations d'entreprises ou essaimage</b>	
<b>Nouveaux projets collaboratifs</b>	
<b>Colloques scientifiques</b>	
<b>Autres (préciser)</b>	

## **E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Publications monopartenaire en journaux internationaux**

Blot N, Veillat L, Rouzé R, Delatte H (2019) Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLOS ONE* 14, e0215466. doi: 10.1371/journal.pone.0215466

Almasri H, Tavares D A, Pioz M, Sené D, Tchamitchian S, Cousin M, Brunet JL & Belzunces LP (2020) Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicol Environ Safety* 203, 111013. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111013

Almasri H, Tavares DA, Tchamitchian S, Pelissier M, Sené D, Cousin M, Brunet JL, Belzunces LP (2021b) Toxicological status changes the susceptibility of the honey bee *Apis mellifera* to a single fungicidal spray application. *Environ Sci Poll Res*. DOI: 10.1007/s11356-021-13747-3

Almasri H, Liberti J, Brunet JL, Engel P & Belzunces LP (2021c) Mild chronic exposure to pesticides alters physiological markers of honey bee health without perturbing the core gut microbiota. *Applied Sciences*, en preparation

### **Publications multipartenaires en journaux internationaux**

Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, 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. doi: 10.1264/jsme2.ME18169.

Almasri H, Tavares DA, Diogon M, Pioz M, Alamil M, Sené D, Tchamitchian S, Cousin M, Brunet JL & Belzunces LP (2021a) Physiological effects of the interaction between *Nosema ceranae* and sequential and overlapping exposure to glyphosate and difenoconazole in the honey bee *Apis mellifera*. *Ecotoxicol Environ Safety* 217, 112258. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112258

Pal E, Almasri H, Paris L, Diogon M, Pioz M, Cousin M, Sené D, Tchamitchian S, Tavares D, Delbac F, Blot N, Brunet JL, Belzunces LP (*in prep*) Toxicity to winter honey bees of imidacloprid, difenoconazole and glyphosate alone or in binary and ternary mixtures: effect on survival and antioxidative defenses. *Toxics*, en preparation.

Rouzé R, Moné A, Tchamitchian S, Delbac F, Esnault O, Delatte H, Belzunces LP, Blot N (2021) Effects of binary or ternary mixtures containing the parasite *Nosema ceranae* and insecticides formulations on the honeybee. *Chemosphere*, en soumission.

### Conférences en colloques internationaux

Almasri H, Pal E, Tavares DA, Tchamitchian S, Sene D, Brunet JL and Belzunces LP (2018) Survival and physiological impacts of pesticides combinations in the honeybee (*apis mellifera*). EurBee 8, 8th Congress of Apidology, 18-20 Sept. 2018, Ghent.

Tavares DA, Almasri H, Tchamitchian S, Sene D, Brunet JL, and Belzunces LP (2018) Impacts of imidacloprid, difenoconazole and glyphosate alone or in mixtures on honey bee. EurBee 8, 8th Congress of Apidology, 18-20 Sept. 2018, Ghent.

Almasri H, Pal E, Tavares D, Sene D, Tchamitchian S, Brunet JL and Belzunces LP (2019) Alteration of survival and oxidative balance induced by subchronic exposure of overwintered honeybees to insecticide, fungicide and herbicide combinations. The 46th Apimondia International Apicultural Congress, 8-12 Sept. 2019, Montréal.

Rouzé R, , Delbac F, Belzunces LP, Blot N (2019) Alterations of the honeybee gut microbiota following chronic exposure to pesticides and an infection by *Nosema ceranae*. Society for Invertebrate Pathology/IOBC Congress, 28 Jul. -1 Aug. 2019, Valencia.

### Conférences en France

#### Conférence pour le Sénat

Belzunces LP (2017) Le déclin des abeilles et des pollinisateurs : Action à bas bruit des stressseurs biologiques et chimiques. Intervention devant le Sénat le 22 fév. 2017 : Table ronde sur les pollinisateurs (vidéo site du Sénat : [http://videos.senat.fr/video.331403\\_58ab7a83207ea.table-ronde-sur-les-pollinisateurs](http://videos.senat.fr/video.331403_58ab7a83207ea.table-ronde-sur-les-pollinisateurs) à 10h06m40sc et 11h00m24s).

#### Conférences pour des congrès apicoles

Belzunces LP (2018) Effets des cocktails de pesticides en association avec des agents pathogènes chez l'abeille. Premier Congrès International d'Apiculture & d'Apithérapie, 25-28 oct. 2018, Rouen.

Belzunces LP (2019) Action complexe des mélanges de pesticides chez les abeilles. 43ème Congrès annuel de la FNOSAD, 25 oct. 2019, Mâcon.

Belzunces LP (2019) Effets cocktails des pesticides chez l'abeille. Association avec les agents pathogènes Journée Technique de l'Adapi, 5 déc. 2019, Puyloubier.

Belzunces LP (2020) La complexité des effets cocktails des pesticides chez l'abeille. Assemblée Générale du Groupement de Défense Sanitaire Apicole des Bouches du Rhône (GDSA13) 25 jan. 2020, Martigues.

Belzunces LP (2020) Effets cocktails des pesticides chez l'abeille. Association avec les agents pathogènes. Assemblée générale du Syndicat des Apiculteurs des Hautes Alpes, 10 mars 2020, Montgardin.

#### *Autres conférences scientifiques*

Rouzé R, Blot N (2018) Impact des facteurs de stress et de leurs interactions sur l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Symposium CIRAD, 13 sept. 2018, Saint-Pierre, La Réunion.

Rouzé R, Moné A, Delbac F, Belzunces L, Blot N (2019) Altérations du microbiote intestinal de l'abeille domestique après exposition à des doses sublétales d'insecticides et une infection par *Nosema ceranae*. 16ème Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, 9 avr. 2019, Clermont-Ferrand.

#### *Conférences de vulgarisation*

Blot N (2018) *Nosema ceranae*, un pathogène émergent de l'abeille mellifère. Animation scientifique du Pôle de Protection des Plantes (CIRAD) et du Groupement de Défense Sanitaire de la Réunion, 18/10/2018, Saint Pierre.

Belzunces LP (2019) Effets cocktails des pesticides chez l'abeille. Association avec les agents pathogènes. Association Bee Friendly et Limdor, 18/06/2019, Saint Yriex-la-Perche.

Belzunces LP (2019) Effets des mélanges de pesticides. Actions létales et physiologiques. Museum d'Histoire Naturelle du Havre, Les Curieux mardi, 15/10/2019, Le Havre.

Belzunces LP (2019) Effets des mélanges de pesticides. Actions létales et physiologiques. Centre pénitentiaire du Havre, 15/10/2019, Le Havre.

Belzunces LP : Effets cocktails des pesticides chez l'abeille. Association avec les agents pathogènes. Journée Technique de l'Adapi, 5 Décembre 2019, Puyloubier.

### **E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION**

Le projet MIXTRESS a ouvert des collaborations avec l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) qui ont abouti au développement du programme de recherche BEERAD soutenu par l'ANR en 2021.

## E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
BONNET Marc	H	?	07/2021	BTS Bioch.	France Marseille	3.7	INRA	Assistant Ingénieur	9	30/11/2016	CDI	EPIC	Assistant ingénieur	Non	Oui
SENE Déborah	F	deborah.sene@laposte.net	Sans objet pour le moment	BTS ABM	France, Marseille	3.5	INRA	Assistante - Ingénieur	9	15/12/2017	CDD	EPST	Assitane ingénieur	Partenaire INRA	Oui
ROUZE Régis	H	rouze.regis@gmail.com	08/2021	M2 Microbiologie	Lyon et Clermont-Ferrand, France	0,5	Université Clermont Auvergne	Doctorant	36	31/06/2020	En recherche d'emploi	-	-	Partenaire LMGE	-
SENE Déborah	F	deborah.sene@laposte.net	Sans objet pour le moment	BTS ABM	France, Marseille	4.25	INRA	Assistante ingénieur	6	09/01/2019	CDD	EPST	Assistante ingénieur	Partenaire INRA	Oui
TCHAMIT CHIAN Tigrane	M	Tigrane.tchamitchian@gmail.com	07/2021	Brevet des collèges	Avignon, France	0	INRA	Technicien	1	31/07/2018	Etudiant	-	-	-	-

### Aide pour le remplissage

- (1) **Adresse email** : indiquer une adresse email la plus pérenne possible
- (2) **Poste dans le projet** : post-doc, doctorant, ingénieur ou niveau ingénieur, technicien, vacataire, autre (préciser)
- (3) **Durée missions** : indiquer en mois la durée totale des missions (y compris celles non financées par l'ANR) effectuées sur le projet
- (4) **Devenir professionnel** : CDI, CDD, chef d'entreprise, encore sur le projet, post-doc France, post-doc étranger, étudiant, recherche d'emploi, sans nouvelles
- (5) **Type d'employeur** : enseignement et recherche publique, EPIC de recherche, grande entreprise, PME/TPE, création d'entreprise, autre public, autre privé, libéral, autre (préciser)
- (6) **Type d'emploi** : ingénieur, chercheur, enseignant-chercheur, cadre, technicien, autre (préciser)
- (7) **Lien au projet ANR** : préciser si l'employeur est ou non un partenaire du projet
- (8) **Valorisation expérience** : préciser si le poste occupé valorise l'expérience acquise pendant le projet.

*Les informations personnelles recueillies feront l'objet d'un traitement de données informatisées pour les seuls besoins de l'étude anonymisée sur le devenir professionnel des personnes recrutées sur les projets ANR. Elles ne feront l'objet d'aucune cession et seront conservées par l'ANR pendant une durée maximale de 5 ans après la fin du projet concerné. Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, les personnes concernées disposent d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données personnelles les concernant. Les personnes concernées seront informées directement de ce droit lorsque leurs coordonnées sont renseignées. Elles peuvent exercer ce droit en s'adressant l'ANR (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/Contact>).*