

2023-2024

Mention Toxicologie Ecotoxicologie

Spécialité Toxicologie Environnementale

# Les effets cocktails du chlordécone avec deux pesticides présents aux Antilles françaises sur *Paracentrotus lividus*

-

Nicolas CROS

Sous la direction de :

- **Pierre-Henri Villard** | MCF, Co-responsable de l'équipe SANTES de l'IMBE
- **Calli Paul** | Doctorante

## Engagement de non-plagiat

Je, soussigné(e), **Cros Nicolas**

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

Nom-Prénom : **Cros Nicolas**

à Marseille, 03/06/24



Cet engagement de non-plagiat doit être inséré en première page de tous les rapports, dossiers, mémoires.

# Les effets cocktails du chlordécone et des principaux pesticides présents aux Antilles sur *Paracentrotus lividus*.

## Table des matières

Résumé .....	4
Abstract .....	4
Abréviations.....	5
Introduction.....	5
a.    Les perturbateurs endocriniens.....	5
b.    Chlordécone.....	6
c.    Autres pesticides et effet cocktail.....	7
d.    L'oursin : <i>Paracentrotus lividus</i> .....	7
e.    Autres modèles d'études .....	8
Matériel et méthode .....	9
f.    Matériel chimique ; .....	9
g.    Oursins, <i>Paracentrotus lividus</i> .....	9
h.    Abeilles, <i>Apis mellifeira</i> .....	10
Résultats.....	11
i.    Extraction d'ARN des Oursins.....	11
j.    Elevage.....	12
k.    Extraction d'ARN des abeilles.....	13
Discussion et conclusions .....	14
l.    Techniques d'analyse .....	14
m.    Conditions d'élevage .....	16
n.    PCR – <i>A. mellifera</i> .....	16
o.    Conclusion et perspectives .....	16
Remerciements .....	17
Références bibliographiques .....	18
Annexes.....	21

## MOTS CLES

Chlordécone  
Effet cocktail  
Perturbateur endocrinien  
Expression de gènes  
Oursins

## Résumé

L'utilisation de produits phytosanitaires est soumise à une forte réglementation avec des tests d'écotoxicités réalisés sur chaque substance. Malgré cela, ils ont été et sont toujours utilisés massivement. Ces pesticides ne se retrouvent pas seuls dans les eaux, les sols et les organismes, beaucoup d'études se sont focalisées sur un effet du produit seul. L'objectif ici est de caractériser les effets cocktails d'un mélange de pesticides (CLD, AMPA et AZ) en concentrations environnementales présentes dans les Antilles françaises. Au cours de mon stage, nous avons mis en place un protocole visant à réaliser cette expérimentation menée sur des oursins *P. lividus*. En parallèle, l'évaluation de l'impact des cultures conventionnelles sur des abeilles *A. mellifera* vise à mieux comprendre les modifications de l'expression de certains gènes. Nos travaux ont montré la complexité de la mise en place d'un protocole non testé sur des animaux vivants tels que des oursins. Le point central de cette expérimentation est l'extraction de l'ARN. Nous avons choisi les gonades qui sont des tissus avec une quantité de matière biologique suffisante. Cependant, les méthodes d'extraction de l'ARN au « TRIzol » a donné des résultats qui n'étaient pas de qualité suffisante pour réaliser le séquençage ARN-Seq. D'autres protocoles doivent être testés. L'élevage fût sujet à discussion, les parois de verre, pour la première fois au contact d'eau de mer, ont absorbé le sel de manière non-négligeable. Un temps de saturation est donc nécessaire. Le matériel utilisé défaillant a entraîné un taux de mortalité de 29,6% chez les oursins nous empêchant de les mettre en présence des trois pesticides. La limite de temps n'a permis d'inclure que l'expression des gènes des échantillons témoins d'abeille, ces derniers sont encourageants en vue de l'analyse comparative.

## KEY WORDS

Chlordecone  
Cocktail effect  
Endocrine disruptor  
Genomics  
Sea Urchin

## Abstract

The use of phytosanitary products is subject to strict regulations, with ecotoxicity tests carried out on individual substances, despite the fact they have been used concurrently on a massive scale. Numerous pesticides coexist in water, soil, and organisms alike, but studies have focused solely on the effect of one single product. One aim of the LiCOCO project is to characterize the cocktail effects of pesticides (CLD, AMPA, & AZ) at environmental concentrations present in the FWI. During my internship we set up a protocol to carry out this experiment on *P. lividus* sea urchins. Simultaneously, we assessed the impact of conventional crops on *A. mellifera* bees to obtain a better understanding of possible changes in gene expression. Our work has shown the complexity of implementing an untested protocol on live animals. The central point of this experiment is RNA extraction. *P. lividus* gonads were used for RNA extraction due to their sufficient biomass. The TRIzol RNA extraction methods yielded results that were unusable for RNA-Seq quality. Other protocols need to be tested. Husbandry was subject to discussion due to the aquariums absorbing salt from the InstantOcean seawater, necessitating a seawater saturation period. Defective equipment resulted in a 29.6% sea urchin mortality rate, preventing the scheduled cocktail pesticides exposure. Due to time constraints, only the gene expression data from the control bee samples were included, providing promising results for the comparative analysis.

## Abréviations

AGD → anogenital distance  
 AChe → Acétylcholinestérase  
*A. mellifera* → *Apis mellifera*  
 AMPA → Acide Aminomethylphosphonique  
 ARNase → Ribonucléase  
 AZ → Azoxystrobine  
 CAT → Catalase  
 CYP → Cytochrome P...  
 CLD → Chlordécone  
 Cq → Cycles d'amplification  
 DEF1 → Défensine 1  
 EDC → Endocrine disrupting chemicals  
 FWI → French West Indies  
 GST → Glutathion-S-Transférase

IMBE → Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale.  
 LICOCO → Living with Chlordécone : an Opportunity-based CO-construction  
 Nt → Nucléotides  
 NTC → No Template Control  
*P. lividus* → *Paracentrotus lividus*  
 PCR → Polymerase Chaîne Reaction  
 POP → Polluant Organique Persistant  
 qPCR → quantitative PCR  
 ROS → Reactive oxygen species  
 RT → Reverse Transcriptase  
 TGML → Transcriptomic and Genomic Marseille Luminy  
 WISORCH → West-Indies-Soil-ORGanoCHlorine

## Introduction

Le traitement de cultures à l'aide de produits phytosanitaires est apparu à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle avec la bouillie bordelaise pour lutter contre le mildiou [1] avant de connaître une explosion dans la deuxième partie du XX<sup>e</sup> siècle. Ces traitements représentent de nos jours un problème environnemental et sanitaire majeur et sont donc soumis à une réglementation, mais celle-ci n'est pas toujours à la hauteur des enjeux. Ces produits phytosanitaires visant à éliminer insectes ravageurs, champignons et plantes adventices impactent tout leur écosystème ayant souvent une action, une cible non spécifique. On retrouve désormais ces substances dans les sols, les eaux, l'atmosphère et même dans le domicile des agriculteurs utilisant ces produits [2]. Le lessivage, le ruissellement et la vaporisation en sont les causes.

### a. Les perturbateurs endocriniens

Les pesticides remplissent généralement leur rôle, par exemple le chlordécone qui a été

utilisé aux Antilles françaises dans la lutte contre le charançon du bananier qui avait développé une résistance au HCH précédemment mis en œuvre dans cette culture. Cependant, les conséquences subsidiaires de l'utilisation des pesticides ont de plus en plus fait l'objet d'un examen attentif, en particulier leur capacité potentielle à perturber la fonction endocrinienne chez les humains et la faune sauvage. Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (2012) : « Un perturbateur endocrinien (EDC) désigne une substance ou un mélange qui altère les fonctions du système endocrinien et de ce fait induit des effets néfastes dans un organisme intact, chez sa progéniture ou au sein de (sous)-populations ». Les PE agissent entre autres en imitant l'action d'une hormone naturelle pour induire une réponse cellulaire ou encore en bloquant le site de fixation de l'hormone, ils peuvent également moduler l'expression des récepteurs nucléaires ou membranaires impliqués dans la réponse endocrine. Ces interactions sont à même de moduler la transmission du signal hormonal. Les PE peuvent aussi perturber la production, la

dégradation, la régulation ou le transport de l'hormone dans l'organisme. Les mécanismes sont géniques ou épigénétiques expliquant certains effets transgénérationnels [3].

Les PE sont connus pour avoir des effets dose-réponse non monotones, comme ce que l'on observe avec les hormones [4]. Les effets de type PE ne sont ainsi peu ou pas mis en évidence dans le cadre des approches réglementaires en toxicologie ou écotoxicologie, les doses mises en œuvre étant le plus souvent trop élevées. Or ces essais permettent d'établir des seuils réglementaires qui n'assurent donc pas une sécurité vis-à-vis des effets de type PE. De nombreux EDCs comme le chlordécone n'échappent pas à ce phénomène. Les cadres réglementaires doivent évoluer pour intégrer les dernières preuves scientifiques sur la perturbation endocrinienne, en priorisant une approche « One Health » assurant la protection de la santé humaine et de l'intégrité environnementale. En effet, une dose plus forte dans l'environnement n'entraîne pas forcément des effets plus nocifs contrairement à une exposition longue et répétée à de faibles doses [4].

#### b. Chlordécone

Le chlordécone CLD fût massivement répandu (en poudre sous le nom de « Kepone » puis « Curlone ») dans les bananeraies des Antilles pour lutter contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, un insecte ravageur de plantations. Bien que rejeté par la Commission d'Etudes de l'Emploi des Toxiques en Agriculture en 1968, il est passé, dans tableau des substance vénéneuses, de la catégorie A à C (substance dangereuse que l'on peut utiliser) en 1972 [5]. Suite au scandale d'Hopewell, ville américaine où était synthétisée le chlordécone et où des travailleurs de l'usine Kepone et des habitants ont été atteints du « Kepone syndrome » (syndrome associant des atteintes

neurologiques sévères à des atteintes testiculaires, avec des chlordéconémies de l'ordre du  $\text{mg.L}^{-1}$ ), le chlordécone est retiré du marché aux Etats-Unis. Cet insecticide ne fût interdit en France qu'en 1990, malgré les alertes de la dangerosité de ce produit via plusieurs autorités 20 ans auparavant. Cette décision tardive a conduit à un scandale sanitaire encore d'actualité auprès des populations antillaises, toujours victimes de cette contamination. Les études épidémiologiques ont mis en évidence une augmentation de la prévalence du cancer de la prostate, avec une augmentation du risque lorsque la chlordéconémie dépasse  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  [6]. Il est considéré comme agent cancérogène et classé en catégorie 2 (cancérogène possible) de la classification CMR de l'Union européenne relative aux substances préoccupantes. Des atteintes du développement cognitif et moteur ont été décrites à la naissance chez des enfants exposés *in utero*. Le suivi de la cohorte a mis en évidence à l'âge de 7 ans une diminution du raisonnement perceptif, de la mémoire de travail et de la compréhension verbale [7]. Un rapport de l'ODE et de l'OFB en 2021 fait état de la présences des pesticides en Martinique [8]. Bien qu'interdit il y a plus de 30 ans, cet insecticide organochloré classé polluant organique persistant POP peut rester dans les sols plus de 100 ans selon le modèle WISORCH [9]. Cette valeur étant revue à la baisse dans la dernière mise à jour de l'étude avec un nouveau modèle (controversé) prévoyant la décontamination des sols dans les années 2070 [10]. Le CLD semble être partiellement dégradé (moindre quantité) grâce à des microorganismes présents dans les andosols tropicaux [11]. Les effets de ces produits de dégradation demeurent méconnus. Une étude menée au sein de l'IMBE sur des hydres exposés au CLD a montré, pour l'expression de certains gènes de stress, des relations concentration-effet non monotones [12]. Avec une augmentation ou parfois une diminution

des niveaux d'ARNm codant pour les enzymes antioxydantes (agissant pour détoxifier les ROS), le CYP1A ou Acétylcholinestérase ACHE, tout cela à des concentrations environnementales. Les impacts du CLD seul ont été décrits, cependant des interactions avec d'autres composés (auxquels les organismes sont exposés) ont lieu dans l'environnement[12].

#### *c. Autres pesticides et effet cocktail*

Si les effets individuels de nombreux pesticides sont bien documentés, la recherche commence seulement à dévoiler les conséquences potentielles des mélanges complexes de pesticides, souvent désignés sous le terme de "cocktails de pesticides" [13]. Ces mélanges peuvent être le résultat de l'application simultanée de plusieurs produits ou alors d'interactions entre plusieurs résidus persistants dans le sol, l'eau, ou les produits alimentaires [14]. Ces interactions peuvent provoquer des effets antagonistes ou additifs, voire de coalition, rendant difficilement prévisibles leur impact global sur la santé humaine et l'environnement en se basant sur des données obtenues après exposition à un seul polluant [15]. Les effets cocktails peuvent entraîner des effets délétères tels des perturbations endocriniennes, des effets neurotoxiques ou des altérations immunologiques, même à des niveaux de concentration où chaque pesticide pris individuellement serait considéré comme inoffensif [16]. Par conséquent, comprendre les effets des cocktails de pesticides est essentiel pour évaluer les risques associés à l'exposition multiple et souvent chronique à ces substances.

Pour étudier l'effet cocktail du CLD avec d'autres pesticides et son impact sur l'expression des gènes (transcriptome), deux pesticides ont été choisis : l'azoxystrobine AZ et l'acide aminométhylphosphonique AMPA.

Les pesticides choisis pour définir un effet cocktail l'ont été en fonction de leur pertinence et de leur présence dans l'environnement. Notre région d'intérêt est la Martinique, il faut donc que nos composés s'y trouvent en abondance. Pour le vérifier, le rapport de l'ODE et la CIRAD « plan chlordécone », qui caractérise tous les pesticides présents dans les eaux de surfaces Martinique montre que ce sont les produits phytosanitaires les plus présents dans les eaux, après le CLD [8]. Le glyphosate et AZ sont ou ont été utilisés dans le monde entier et des études toxicologiques ont déjà été menées sur ces composés, ce qui conforte le choix de ces phytosanitaires [17]. L'AMPA est le métabolite principal du glyphosate, un herbicide organophosphoré, il a été associé à une augmentation de la méthylation de l'ADN [18], de l'expression de gènes associés à la fonction thyroïdienne [19] ? Ou encore une augmentation de la distance anogénitale (AGD) a été corrélée à l'augmentation de concentration d'AMPA dans l'urine maternelle [20]. Cette dernière étude montrant entre autres les propriétés de PE de ce pesticide, l'AGD étant un marqueur d'hormone prénatale (mise en évidence d'un effet tératogène). L'AZ et un fongicide ayant une haute toxicité pour les écosystèmes, quelques études écotoxicologiques sur des invertébrés en milieu aquatiques furent donc réalisées. Il induit tout d'abord des effets reprotoxiques avec baisse de vitellogénine et d'oestradiol chez la femelle et une baisse de fertilité chez les mâles[21]. Des courbes doses réponses non monotones caractéristiques des ECDs ont été mises en évidence. De plus une augmentation de ROS est observée[22], cette dernière visible au niveau de la génération F1 dans une autre étude de toxicité transgénérationnelle[23].

#### *d. L'oursin : *Paracentrotus lividus**

L'oursin possède un squelette calcaire arrondi

et pentaradiare caractéristique de la classe des échinoïdes dans l'embranchement des Echinodermes, c'est donc un invertébré. Cette classe permet de ne pas avoir besoin d'autorisation spéciale pour l'utiliser dans une étude expérimentale « *Décret n° 2013-118 du 01.02.2013* » (à l'exception des céphalopodes). Dans leur environnement, ils sont essentiels à l'intégrité des écosystèmes, en broutant les algues, ce qui forme des espaces libres pour les coraux ou encore en régulant des espèces envahissantes. C'est un groupe d'espèces sentinelles car exposé à répétition à des pressions abiotiques et biotiques comme les pathogènes, les substances polluantes, les changements de températures et de pH ou encore la prédation [24]. Ce groupe bénéficie d'un grand nombre d'utilisation en laboratoire car il est abondant, résistant et facile à manipuler. Leur croissance rapide permet une production de gonade après seulement 3 à 4 mois[25], et leur longue durée de vie permet des tests d'écotoxicité chronique[26]. Le développement embryonnaire est rapide et très sensible aux xénobiotiques[24].

Un consortium de chercheurs entreprend d'entièrement séquencer le génome d'un oursin, d'une autre espèce mais très proche, *Strongylocentrotus purpuratus*, donnant un séquençage complet des 814 mégabases qui a été publié en 2006 [27]. Le génome de *P.lividus* est également séquencé en grande partie depuis 2023 [28]. Un avantage non négligeable de l'oursin est sa similarité avec le génome humain avec 70% de gènes communs contre par exemple 40% pour la drosophile, ce qui en fait donc un modèle de choix pour développer des méthodes alternatives. Etant un des invertébrés le plus proches des chordés[24], de nombreuses voies de signalisation ont été conservées comme la voir Wnt Hedgehog régulant la prolifération et la différenciation cellulaire, ou les réponses au stress oxydatif [25]. Le génome de *P.lividus* étant séquencé, le séquençage des ARNs après exposition à des

polluants est la méthode privilégiée permettant d'observer l'expression différentielle de tous les gènes[29].

#### e. Autres modèles d'études

Les abeilles présentent une sensibilité accrue aux pesticides, ce qui fait de ce groupe un bioindicateur d'intérêt. En tant que pollinisateur elles sont indispensables au bon fonctionnement de l'agriculture, étant ubiquiste dans les campagnes, nous pouvons comparer des individus de plusieurs zones avec différents types d'agriculture. Elles accumulent les polluants, permettant de réaliser une évaluation qualitative et quantitative de la pollution[30]. Les pesticides utilisés dans l'agriculture ont fréquemment des activités de type EDC et peuvent impacter l'expression de divers gènes. L'expression des gènes d'*Apis mellifera* a été observée par QRT-PCR en utilisant des gènes cibles associés à la réponse au stress[31]. L'objectif de cette étude sera de déterminer si les différentes pratiques agricoles peuvent moduler l'expression de certains gènes et permettre d'utiliser les abeilles pollinisatrices en tant que bioindicateurs pouvant alerter sur la santé humaine et environnementale. Les néonicotinoïdes induisent, à concentration environnementale, une infertilité chez les mâles [32]. Dans un contexte où hommes les européens sont soumis à une baisse de la fertilité ces dernières décennies, ces résultats sont à approfondir. Il s'agit d'un indicateur de la santé environnementale qui contribue à l'approche « One Health » de la Commission européenne.

La réglementation statue sur des seuils de substances prises une à une, or cela ne retranscrit pas la réalité des individus animaux ou végétaux exposés. C'est cette interaction entre pesticides avec le CLD que le projet LICOCO vise à décrire avec des effets pouvant être : additifs, synergique ou antagoniste[15].

Ce projet LICOCO (Living with Chlordecone : an Opportunity-based CO-construction)) vise, à long terme, à mieux comprendre les effets cocktails avec le CLD et leur impact sur l'expression des gènes afin d'établir une nouvelle législation aux Antilles.

## Matériel et méthode

### f. Matériel chimique ;

Echantillons de pesticides en poudre.

- CLD, 5 mg provenant d'Azur Isotope® (Marseille, France) avec une pureté supérieure à 97%
- AZ, 10 mg provenant de Sigma-Aldrich®
- AMPA, 10 mg provenant de Sigma-Aldrich®

Structure chimique des substances : (annexe 1)

### g. Oursins, *Paracentrotus lividus*

108 oursins âgés de deux ans, théoriquement 50/50 mâle/femelle. Les animaux proviennent d'un élevage de l'Université de Pascal Paoli « UMS Stella Mare Corsica® », ils sont nés et ont été élevés dans de l'eau de mer ultra-filtrée. Ils sont nourris avec du maïs et des carottes BIO. Après une acclimatation de trois

mois en aquarium à 19°C avec une salinité de 37ppt ou g/L, les oursins sont déplacés dans des cristallisoirs en verre de 5L. Nous les avons remplis avec 3L d'eau, eau d'abord filtrée avec un Osmoseur Aquapro AIC-25® de Aquariopure® afin d'éliminer des éléments indésirables. Du sel marin de Instant Ocean de Aquarius Systems® et ensuite ajouté dans l'eau osmosée pour atteindre une concentration de 37 ppt. Cette salinité est vérifiée toutes les heures jusqu'à stabilisation puis à minima une fois tous les deux jours à l'aide d'un réfractomètre de la marque Red Sea®. Afin d'obtenir une eau correctement oxygénée, une pompe easy flux 200 de Tecatlantis® est placée dans chaque cristallisoir. L'eau est changée toutes les semaines, on remplace 1,5L par de l'eau osmosée à 38 ppt en essayant de retirer le plus de particules et d'aliments possibles. Le volume évaporé est également compensé. Le nourrissage dans les cristallisoirs a lieu une fois par semaine avec 11g de carottes BIO découpées en rondelle par contenant. Un plan de disposition des cristallisoirs et un calendrier de nourrissage ont été établis (annexe 3&4). 6 oursins sont disposés par contenant afin de correspondre au plan d'expérimentation (annexe 4&5). Cela permet d'avoir les deux sexes présents (impossible à déterminer sans dissection).

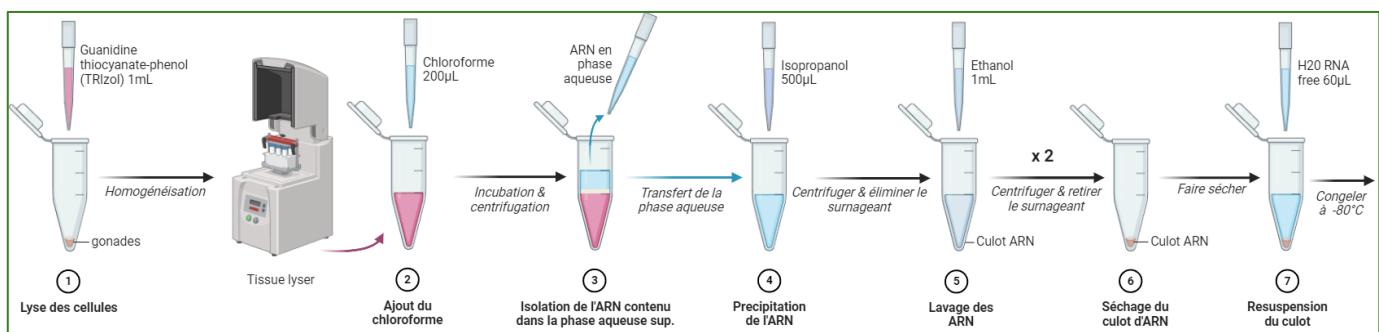


Figure 1: Schéma du protocole d'extraction de l'ARN depuis les gonades d'un oursin. Protocole testé en amont sur des individus sauvage puis généralisé aux 108 individus.

Pour standardiser le protocole d'extraction d'ARN puis avoir un aperçu des résultats du bioanalyseur, des oursins sont prélevés en mer méditerranée. Ils sont découpés en deux avec des ciseaux puis leurs gonades sont extraites et directement placées dans du Trizol et congelées à -80°C. S'en suit la lyse tissulaire avec une bille de 5mm par Eppendorf et le Qiagen Tissue Lyser® puis le protocole d'extraction de l'ARN (Figure 1: ).

Une fois l'ARN extrait, il est placé dans 60µL d'eau dépourvue d'ARNase puis congelé à -80°C. Ces 3 échantillons d'ARN provenant de gonades de trois oursins ont été notés G1, G2 et G3. Avant de réaliser les analyses aux bioanalyseur il nous faut connaître la quantité d'ARN avec un NanoDrop, le Thermo Fisher Scientific NanoDrop One®. Une fois l'ARN quantifié dans les échantillons on sait quelle puce utiliser dans le bioanalyseur, ici une NanoChip (taille de la puce). Le kit RNA 6000 Nano® permet de remplir la puce RNA Nano LabChip® avec le mélange gel-colorant, chacune des 12 chambres de mesure s'est vue occupée de neuf échantillons d'ARN et de trois contrôles négatifs (marqueur fourni). L'analyse a ensuite lieu avec le modèle Agilent 2100 Bioanalyzer®. Les échantillons sont déposés dans les micropuits puis se déplacent dans les microcanaux par différence de potentiel. Chaque échantillon est injecté dans le canal de séparation qui permet la séparation par électrophorèse capillaire. Les ARN sont ainsi séparés par taille puis détectés grâce à la fluorescence d'un agent intercalant. Le profil de la courbe ainsi que le RIN (RNA integrity number) nous indiquent la qualité de l'ARN, Le RIN s'étend de 0 à 10 et il faut un minimum de 8 pour une qualité correcte afin de réaliser le séquençage de l'ARN[33].

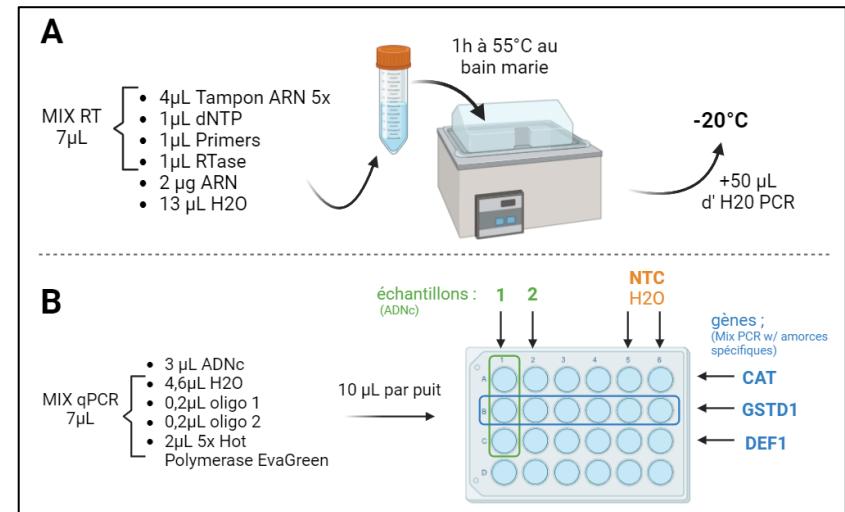


Figure 2 : Protocole pour la préparation des plaques qPCR. A : préparation de la RT, B : Mix PCR, contrôle, échantillons et disposition sur la plaque. qPCR réalisée sur CFX Opus Real-Time PCR System®

#### h. Abeilles, *Apis mellifera*

Elles sont issues de 7 ruches différentes, deux ruches entourées de parcelles en agriculture biologique, les 5 autres par de l'agriculture conventionnelle (Il y a 3 individus par site de prélèvement). Les individus sont disséqués afin d'extraire la glande hypopharyngienne GH, le tube digestif TD et le corps gras CG. Chacun des 3 échantillons contient donc GH, TD ou CG de 3 individus. Dès leur extraction, les échantillons sont placés dans un Eppendorf 2mL avec 1mL de trizol. L'extraction d'ARN des échantillons s'effectue fait avec le même protocole que pour les oursins (Figure 1: ). Cette étape passée, un Nanodrop est réalisé pour connaître les quantités d'ARN extraites, et une QRT-PCR est menée. Dans un premier temps, sous l'action d'une transcriptase inverse (RT), les ARN donnent naissance à des ADNc. Ensuite a lieu la PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) avec la CFX Opus Real-Time PCR System® qui permet au moyen d'amorces spécifiques d'amplifier les gènes d'intérêt (figure 2). La première étape à

95°C et la dénaturation de l'ADN double brin, ensuite a lieu l'hybridation des amores (contenues en excès) à la température de demi-dénaturation Tm spécifique (annexe 5). A 72°C se déroule l'élongation avec la Taq Polymérase qui est conservée à -20°C avant utilisation. La quantité d'ADN synthétisée est mesurée en temps réel par fluorimétrie en utilisant du SYBR Green qui s'intercale dans l'ADN double brin et devient fluorescent. Nous avons utilisé le kit EVA®Green. En tant que contrôles négatifs, pour chaque gène étudié, de l'H2O est utilisée à la place de l'ADNc (puits notés NTC). Après les résultats de la PCR on se base sur le Cq pour calculer les concentrations (tableau 3).

Les ADNc de 12 gènes présentés ci-dessous ont été amplifiés par qPCR, (les amores pour chaque gène sont indiquées en annexe 7) :

- Gène de référence : Actine
- Stress oxydatif : Catalase, SOD1
- Enzymes de phase I : CYP6AQ1, CYP9Q2, CYP9Q3 (impliqués dans la fonctionnalisation des pesticides)
- Enzymes de phase II : GSTD1 (impliquée dans la dégradation des pesticides)
- Neurotoxicité : Acétylcholine estérase

## Résultats

### i. Extraction d'ARN des Oursins

Les 3 solutions après extraction de l'ARN des gonades d'oursins nous donnent des quantités d'ARN de 343, 1535 et 3443 ng/mL d'acide nucléique pour G1, G2 et G3 (Tableau 1).

- Homéostasie cellulaire, protéines chaperonnes : Hsp 70
- Système immunitaire (chez l'abeille) : Défensine 1&2
- Vitellogénine (marqueur d'une activité pro-oestrogénique, impliqué dans la réponse au stress)

Les recherches bibliographiques sont effectuées sur Science Direct, PubMed, Scientific Reports ainsi qu'avec les différents rapports sur les contaminations aux Antilles. La prospection d'articles scientifiques se fait à l'aide de mots clés comme le nom d'une espèce, d'un pesticide ou d'un gène. Avec un filtre priorisant les articles les plus récents (10 dernières années).

Tableau 4 : résultats des nanodrop

Date	Échantillon	Acide nucléique (ng/mL)
05/21/24 <i>P. lividus</i>	G1 (gonades oursins)	343.206
	G2	1534.613
	G2	3442.922
22/05/24 <i>A. mellifera</i>	1 GH bio	180.8
	2 TD bio	444.0
	3 CG bio	940.8
	4	306.8
	5	604.8
	6	1296.0

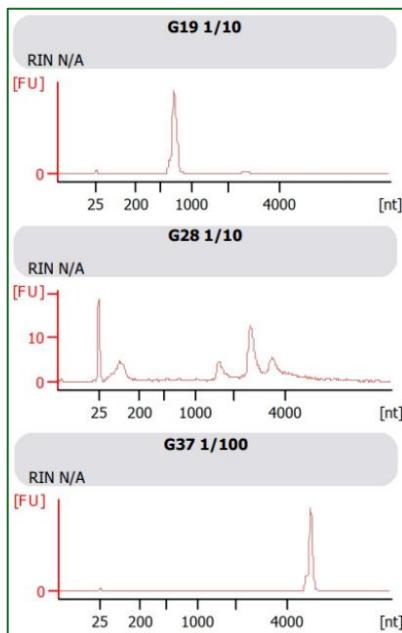


Figure 3 : Résultats du bioanalyseur, RIN = RNA Integrity Number, FU = Unité de Fluorescence

Les RIN de bioanalyseur sont notés N/A (non available) donc égal à 0. Le pic à 25 nt dans les 3 échantillons représente le « ladder », l'échalon externe à partir duquel on peut lire les résultats. Avec un profil contenant un seul pic à 800 nt pour G1, un pic à 5000 nt pour G3 et 5 pics moyennement définis pour G2 (Figure 3). ARN ratio [28s / 18s] respectifs : G1 = 3.5, G2 = 2.9 et G3 = 4.8.

#### j. Elevage

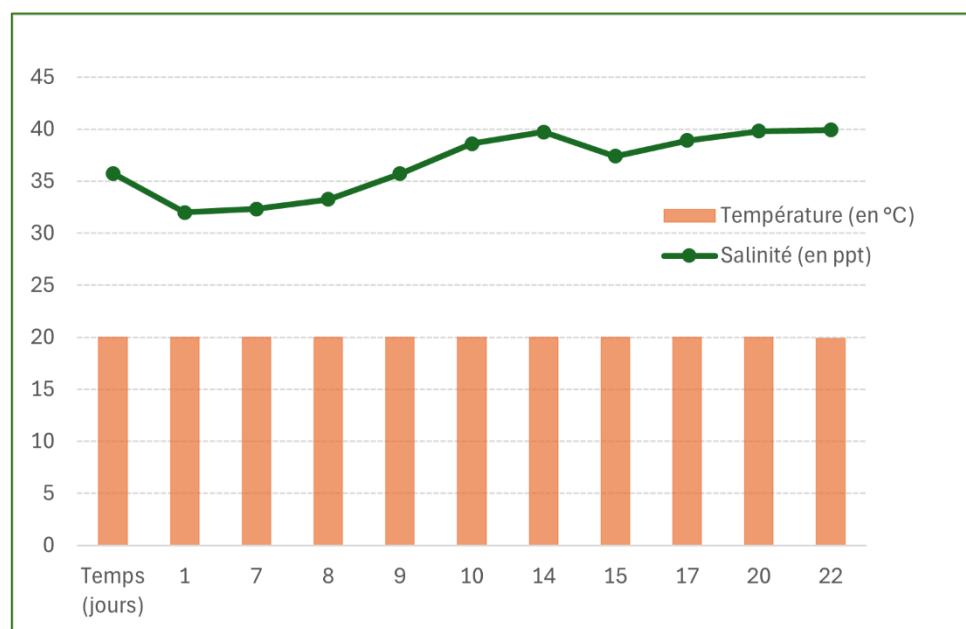


Figure 4 : Salinité et température de l'eau des cristallisoirs dans le temps.

La salinité est mesurée dans les 16 cristallisoirs tous les deux jours hormis lors des fermetures de la station marine. Chaque donnée de salinité représente la moyenne des 16 relevés. L'eau

osmosée ajoutée l'est toujours à 38 ppt (eau de mer artificielle), la salinité moyenne est d'environ 33 ppt pendant 6 jours puis aux alentours 39,5 durant les derniers jours.

Plusieurs concentrations et rajouts de sels ont été nécessaires pour aboutir aux concentrations finales. La température reste à 20°C durant 21 jours et ~300mL d'eau s'évapore des cristallisoirs chaque semaine. Les oursins ont été ajoutés au jour 7 avec 6 individus par cristallisoir. Une perte de spinules fut observée après leur changement de milieu puis une repousse lente et partielle s'est opérée au cours du temps. Sur un total de 108 oursins, 32 sont morts, soit un taux de survie de 70,37%. Certaines pompes ont cessé de

fonctionner, 6 sur un total de 18.

#### *k. Extraction d'ARN des abeilles*

Les 6 échantillons provenant de cultures BIO sont analysés au nanodrop (*tableau 1*), on observe une quantité d'ARN de 180,8 ng/mL au minimum pour les glandes hypopharyngiennes et un maximum de 12960 ng/mL pour le corps gras. Les premières QRT-PCR révèlent des hybridations très tardives avec  $Cq > 35$ , les températures d'hybridation ont donc été augmentées.

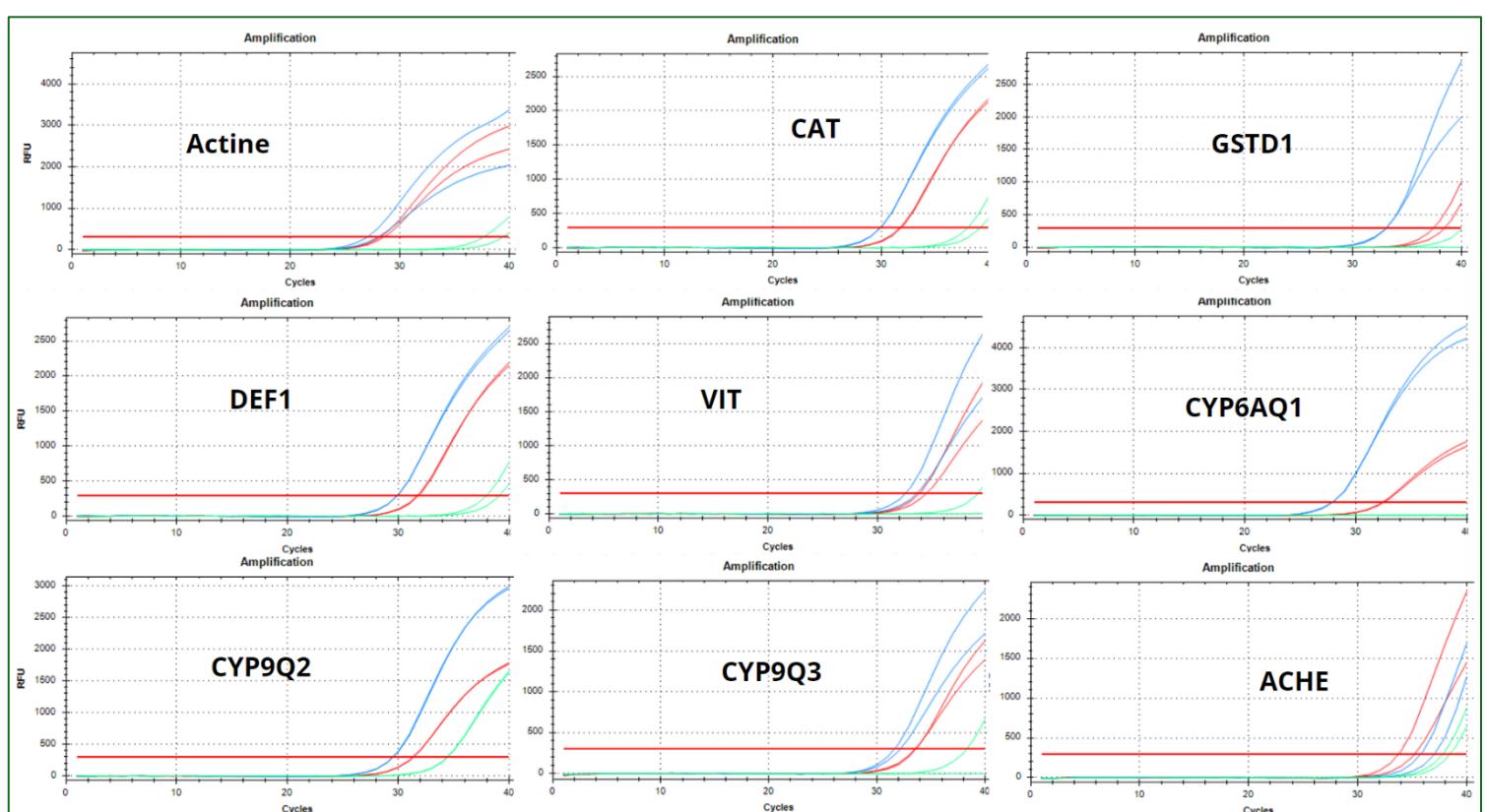


Figure 5 : Courbes d'amplification de la PCR quantitative pour 9 gènes cibles : ROUGE = échantillon 1, BLEU = échantillon 2, VERT = NTC (No Template Control)

L'échantillon 1 désigne les GH extraits de l'abeille provenant de l'Oise et entourée culture BIO, l'échantillon 2 contient les TD extraits de 3 individus provenant de la même zone. La qPCR a lieu après réalisation de la transcription inverse pour obtenir les ADN complémentaires de ces deux échantillons.

Les NTC qui ne contiennent pas d'ADNc sont marqués par les amores et amplifiés après le 35<sup>e</sup> cycle dans certains échantillons. Cela concerne les deux duplcatas de NTC des gènes CAT, CYP9Q2 et ACHE ainsi qu'un seul duplcata des gènes CYP9Q3 et VIT. Tous les autres puits présentent une amplification nulle (N/A)

(figure 5). La différence entre Cq de GH et TD est inférieure à 2 pour Actine, CAT, VIT, ACHE, CYP9Q2 et CYP9Q3. Et supérieure à 2 pour GSTD1 et CYP6AQ1 (tableau 3). Les niveaux de fluorescence les plus élevés après 40 cycles sont entre 2000 et 3500 pour l'actine et plus de 4000 pour l'échantillon 2 de CYP6AQ1. Les courbes de fusion présentent 1 pic de fusion pour Actine, CAT, DEF1, VIT, CYP6AQ1 et deux pics (un avant ou après le principal) pour GSTD1, CYP9Q2, CYP9Q3, ACHE (figure 6).

Tableau 3 : Nombres de Cq (cycles d'amplification à partir desquels la fluorescence est détectée) moyens pour chaque gène et pour NTC (Contrôle -)

Gène cible	Échantillon 1 GH	Échantillon 2 TD	NTC
Actine	28,32	27,48	N/A
Catalase	27,48	29,95	38,51
Glutathion-S-transférase D1	37,97	33,10	N/A
Défensine 1	28,57	31,64	N/A
Vitellogénine	34,08	33,00	N/A et 39,11
CYP AQ1	32,36	27,80	N/A
CYP 9Q2	31,34	29,50	34,42
CYP 9Q3	33,52	31,86	N/A et 39,27
ACHE	34,49	36,42	38,13

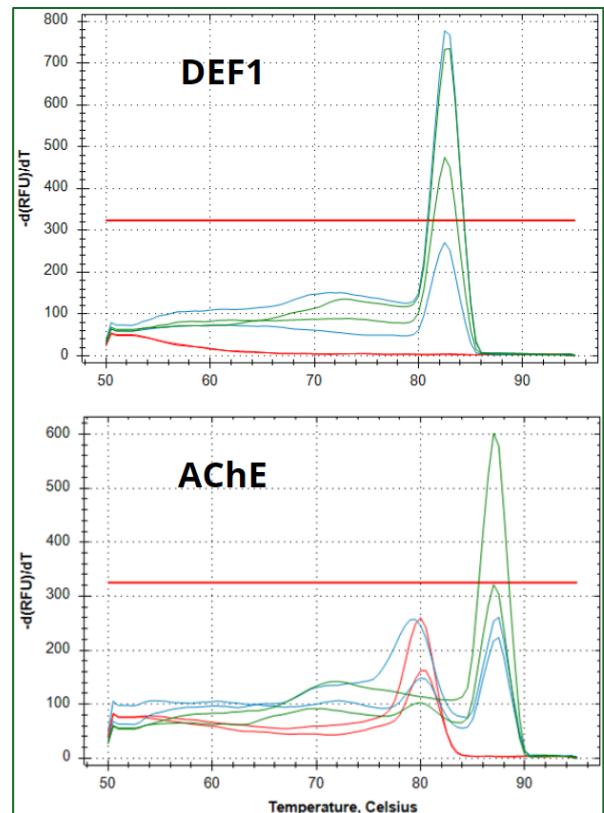


Figure 6 : Courbes de fusion des gènes cibles Défensine 1 et Acétylcholine Estérase

## Discussion et conclusions

### I. Techniques d'analyse

Nous avons recours à deux techniques : être le séquençage ARN et la QRT-PCR. Elles visent toutes deux la visualisation de l'expression des gènes, cependant on ne les utilise pas

exactement dans le même contexte. La PCR détermine l'expression des gènes en fonction de gènes cibles connus. On teste un échantillon pour connaître la présence d'un ou plusieurs gènes spécifiques. Avec les abeilles, nous connaissons déjà les principaux effets induits par les pesticides comme les néonicotinoïdes[31] et ainsi on sait quels gènes

il est intéressant d'observer. Le séquençage ARN est la détermination de l'expression de tous les gènes présents dans l'échantillon (tout le transcriptome). Même des transcrits inconnus peuvent être identifiés à l'aide du génome de référence. C'est intéressant si l'on ne sait pas exactement quel gène observer, l'interaction entre pesticides pouvant engendrer des effets multiples et encore inconnus sur l'expression. L'utilisation du séquençage dans l'étude LICOCO va permettre d'obtenir des données de qualité pour l'analyse d'expression différentielle du génome [29]. La RT-PCR peut tout de même être utilisée en complément du séquençage ARN pour confirmer les résultats.

Le bioanalyseur nous montre la qualité de l'ARN (RIN >8) [33], la dégradation et enfin le profil avec chaque pic de fluorescence avec chaque pic représentant un fragment d'ARN. Nos résultats présentent tous un RIN inexistant (*Figure 3*), pourtant les résultats du nanodrop (*Tableau 1*) semblent nous montrer une quantité d'ARN suffisante. Les gonades où les cellules sont plus concentrées sont donc un bon choix car leur taille facilite l'extraction et elles permettent d'obtenir assez de matériel biologique pour un seul individu [26]. En fait on ne peut pas distinguer l'ARN, l'ADN ou les acides nucléiques, ceux-ci ayant le même spectre d'absorption. Trois possibilités se présentent donc : l'ARN est dégradé durant les processus d'extraction/stockage/analyse ou il y a eu contamination des échantillons par ARNase durant ces mêmes étapes, ou par ADN lors de la séparation de la phase aqueuse lors de l'extraction (*figure 1*). Sur le plan structurel, l'ARN, se présente sous la forme de brins simples constitués de nucléotides composés de sucres riboses attachés à des bases azotées et à des groupes phosphate [35]. S'il y a des pics de très haut poids moléculaire (>4000 nt) ou du signal entre les pics, ce peut être des pics génomiques (contamination ADN) [34].

L'ARN fût conservé à -80°C mais les échantillons ont subit un voyage (dans une glacière) pour les transporter d'un laboratoire à un autre. Le protocole d'extraction utilisé avec le kit TRIzol® n'est pas optimal, une publication où sont comparés plusieurs kits (profils Bioanalyzer) lors de l'extraction d'ARN dans des embryons de *P. lividus* remet en question son efficacité. En effet les kits d'extraction comme Total RNA mini® ou RNeasy® ou Airum kit® engendrent tous trois des résultats avec une meilleure qualité que le kit TRIzol® [36]. Le TRIzol® a été décrit pour être efficace dans la stabilisation de l'ARN à partir de gonades [37]. Pour que des échantillons d'ARN eucaryote soient de haute qualité ils doivent présenter des pics 18s et 28s distincts avec un ratio 2.0 [33], une absence de pics plus petits entre les deux pics ribosomiques (également connus sous le nom d'inter région) et une ligne de base plate avant le premier pic ribosomique 18s [38]. Nos résultats indiquent une dégradation complète de l'échantillon en raison de l'absence des pics 18s et 28s (*annexe 8*), de l'absence du rapport 2.0 et de l'absence d'une ligne de base plate (*figure 3*) [33], [38]. L'échantillon G2 comprend le fragment marqueur à 25 nt, suivi d'une succession de fragments ribosomiques plus courts, puis d'une ligne de base élevée entre les deux pics ribosomiques et avant le pic 18s présumé. Ce profil représente une dégradation progressive typique, caractérisée par des pics ribosomiques plus courts le long de l'axe NT [33]. Les échantillons G1 et G3 présentent une dégradation de l'ARN totale avec un seul pic dans la région post 28s (G3), et un pic dans la région pré 18s (G1). La dégradation des échantillons peut être attribuée à la dégradation par la chaleur, ainsi que par des enzymes connues sous le nom de ribonucléases (ARNases). Les sources de ribonucléases comprennent la peau, la poussière, les réactifs, et même l'échantillon en lui-même [39]. Afin de prévenir la dégradation

de l'ARN (*figure 3*), il est recommandé de travailler avec précaution. Pour ce faire, il convient d'utiliser des gants stériles, des consommables en plastique à usage unique, des techniques aseptisées, des techniques de décontamination, des réactifs de qualité dits exempts de RNase, un inhibiteur d'ARNase appliqué à l'échantillon et un stockage approprié de l'échantillon à -20°C ou moins [39].

#### *m. Conditions d'élevage*

L'usage d'animaux vivant et leur maintien en condition d'élevage varie fortement selon les espèces et peut contenir de nombreux biais. Le stress occasionné depuis le transport vers la Corse est négligeable au vu du long temps d'acclimatation, en revanche le transport entre l'aquarium et les cristallisoirs avec en premier lieu le décollement de leur paroi puis le changement d'environnement est forcément source d'un grand stress chez les individus. La mortalité peut être causée par ce facteur mais aussi et surtout par les pompes défaillantes empêchant l'eau de s'oxygénérer correctement. Cette mortalité élevée nous a amené à reporter ultérieurement l'exposition des oursins aux pesticides. Le stress peut avoir des effets multifactoriels sur la transcription et donc sur les résultats du séquençage d'ARN, une période d'une semaine d'acclimatation avant l'exposition aux pesticides est conseillée [40]. La salinité de 38 g/L fût difficile à atteindre, nous savons que le verre avec ses groupes silanols Si-OH développent des interactions avec les cations des sels comme le Na<sup>+</sup> du NaCl. L'adsorption de NaCl est normalement négligeable dans des aquariums ayant déjà contenu de l'eau de mer artificielle car les sites silanols sont saturés. Or, ce n'était pas le cas avec les cristallisoirs qui étaient neufs. On peut considérer que la saturation fût atteinte aux alentours du 14<sup>ème</sup> jour (*figure 4*).

#### *n. PCR – A. mellifera*

Les échantillons analysés avant la date du rapport ne représentent que les abeilles butineuses prélevées proches de cultures BIO, c'est donc l'expression de leur gène d'intérêt qui va nous servir de niveau de base. Ces individus ne sont théoriquement pas ou très peu exposés à des pesticides dans leur environnement. L'objectif est d'observer les différences d'expression en fonction de la « pollution » du milieu grâce à cet excellent bioindicateur, de plus les abeilles étant également présentes dans les Antilles Françaises, cela constitue une perspective d'étude si les résultats sont concluants. Mais une ruche n'a pas une zone d'alimentation précise, hypothèses et approximations sont donc faites.

Le protocole d'extraction d'ARN est le même que pour *P.lividus* bien que non concluant au bioanalyseur car la PCR nécessite une qualité de l'ARN plus faible[29]. Le gène de ménage, l'Actine montre une forte expression (*figure 5*), ce qui est positif car ce gène est censé s'exprimer de manière constante et servira de référence pour tenir compte de la variabilité de la réaction de transcriptase inverse. Tous les gènes sont amplifiés entre le 28 et le 35<sup>ème</sup> cycle ce qui montre une expression correcte. Cependant pour les NTC il ne devrait pas y avoir de signal d'amplification, il sera nécessaire de refaire une analyse en augmentant légèrement la température d'« annealing » afin d'accroître la spécificité. La température sera légèrement augmentée pour les gènes ayant des courbes de fusion à deux pics comme l'acétylcholine estérase (*figure 6*) afin d'améliorer la spécificité.

#### *o. Conclusion et perspectives*

Nos résultats nous poussent à améliorer le protocole d'extraction en s'appuyant sur la littérature et en réalisant d'autres essais pour obtenir un ARN de meilleure qualité. Comme le

RNA easy Mini® ou le kit Aurum® afin de réaliser le séquençage auprès de la plateforme TGML et de confirmer la qualité du séquençage de l'ARN.

L'acclimatation des oursins devra être plus longue avant l'expérimentation et le matériel testé pendant quelques jours avant introduction des animaux. Comme nous l'avons remarqué l'adsorption de NaCl est non négligeable et il faudra attendre la saturation du verre caractérisée par la stabilisation des concentrations pour envisager de placer les oursins dans le milieu. L'absorption des pesticides par les parois, et les déjections de *P.lividus* reste à quantifier. L'oursin comme modèle d'étude est intéressant avec une quantité conséquente d'acide nucléique dans les gonades, la principale difficulté est la gestion du stress de l'animal. Des périodes

d'acclimatation seront nécessaires (une semaine avant mise en présence des pesticides).

Une fois les conditions expérimentales de la PCR chez l'abeilles mises au point, l'efficacité de l'amplification sera déterminée au moyen d'une gamme de dilution des ADNc. Nous aurons une base pour une analyse comparative de l'expression des gènes. Une fois comparé aux 12 échantillons proches de cultures conventionnelles cela permettra de mieux comprendre l'impact des produits utilisés dans l'agriculture (donc à des concentrations environnementales) et son impact global.

Les travaux réalisés sur la durée du stage permettront d'établir les bases pour l'élaboration du protocole définitif, de l'élevage d'oursins au séquençage de leur ARN.

---

## Remerciements

J'aimerais commencer par remercier Monsieur Pierre-Henri Villard qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce stage. Sa confiance, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie particulièrement Madame Calli Paul qui m'a accueilli chaleureusement pour l'accompagner dans la première étape de sa thèse durant 2 mois. Je la remercie également pour sa bonne humeur, nos conversations et ses précieux conseils.

Je remercie spécialement Monsieur Paul Mirleau, référant à la station marine d'Endoume, pour toutes les discussions/conseils à propos de la biologie marine ainsi que de m'avoir partagé son expérience sur la plongée sous-marine.

Je remercie Madame Patricia Bremond pour ses précieux conseils techniques au laboratoire, sa bienveillance et la pédagogie dont elle fait preuve

Je remercie Monsieur Xavier Mirleau avec qui j'ai pu tenir des échanges enrichissants sur l'écotoxicologie et mon orientation professionnelle.

## Références bibliographiques

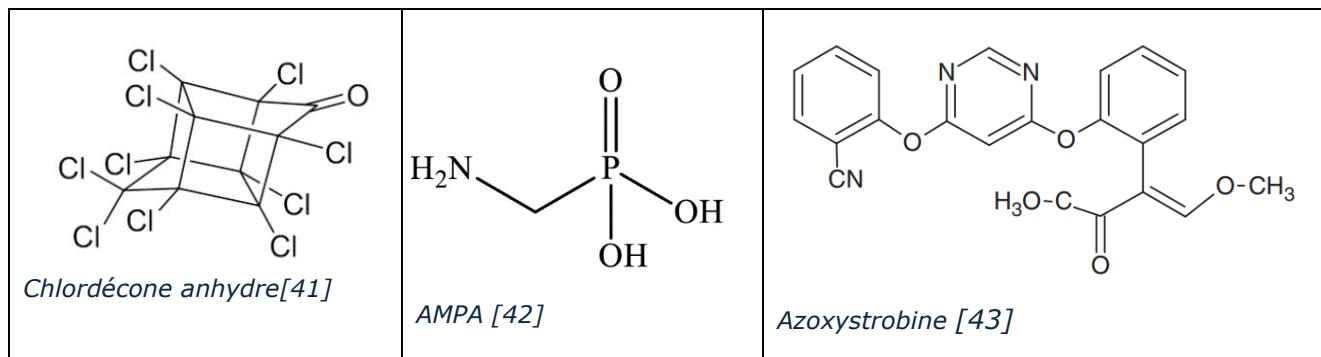
- [1] F. Vogelweith et D. Thiéry, « An assessment of the non-target effects of copper on the leaf arthropod community in a vineyard », *Biol. Control*, vol. 127, p. 94-100, déc. 2018, doi: 10.1016/j.bioc.2018.08.011.
- [2] V. Silva et al., « Pesticide residues with hazard classifications relevant to non-target species including humans are omnipresent in the environment and farmer residences », *Environ. Int.*, vol. 181, p. 108280, nov. 2023, doi: 10.1016/j.envint.2023.108280.
- [3] A. C. Gore et al., « EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals », *Endocr. Rev.*, vol. 36, n° 6, p. E1-E150, déc. 2015, doi: 10.1210/er.2015-1010.
- [4] L. N. Vandenberg et al., « Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses », *Endocr. Rev.*, vol. 33, n° 3, p. 378-455, juin 2012, doi: 10.1210/er.2011-1050.
- [5] M. Fintz, « Éléments historiques sur l'arrivée du chlordécone en France entre 1968 et 198 ».
- [6] L. Multigner et al., « Chlordécone Exposure and Risk of Prostate Cancer », *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, n° 21, p. 3457-3462, juill. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.27.2153.
- [7] Y. Oulhote et al., « Prenatal and childhood chlordécone exposure, cognitive abilities and problem behaviors in 7-year-old children: the TIMOUN mother-child cohort in Guadeloupe », *Environ. Health*, vol. 22, n° 1, p. 21, févr. 2023, doi: 10.1186/s12940-023-00970-3.
- [8] G. Lala et M. Bocaly, « Suivi des produits phytopharmaceutiques dans les cours ».
- [9] Y.-M. Cabidoche, R. Achard, P. Cattan, C. Clermont-Dauphin, F. Massat, et J. Sansoulet, « Long-term pollution by chlordécone of tropical volcanic soils in the French West Indies: A simple leaching model accounts for current residue », *Environ. Pollut.*, vol. 157, n° 5, p. 1697-1705, mai 2009, doi: 10.1016/j.envpol.2008.12.015.
- [10] I. Comte, A. Pradel, A. Crabit, C. Mottes, L. T. Pak, et P. Cattan, « Long-term pollution by chlordécone of tropical volcanic soils in the French West Indies: New insights and improvement of previous predictions », *Environ. Pollut.*, vol. 303, p. 119091, juin 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.119091.
- [11] J. D. Fernández-Bayo, C. Saison, M. Voltz, U. Disko, D. Hofmann, et A. E. Berns, « Chlordécone fate and mineralisation in a tropical soil (andosol) microcosm under aerobic conditions », *Sci. Total Environ.*, vol. 463-464, p. 395-403, oct. 2013, doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.044.
- [12] X. Moreau et al., « Hydra bioassay for the evaluation of chlordécone toxicity at environmental concentrations, alone or in complex mixtures with dechlorinated byproducts: experimental observations and modeling by experimental design », *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 29, n° 60, p. 91017-91035, déc. 2022, doi: 10.1007/s11356-022-22050-8.
- [13] M. Liess, S. Henz, et N. Shahid, « Modeling the synergistic effects of toxicant mixtures », *Environ. Sci. Eur.*, vol. 32, n° 1, p. 119, déc. 2020, doi: 10.1186/s12302-020-00394-7.
- [14] F. P. Carvalho, « Pesticides, environment, and food safety », *Food Energy Secur.*, vol. 6, n° 2, p. 48-60, mai 2017, doi: 10.1002/fes3.108.
- [15] M. Holmstrup et al., « Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review », *Sci. Total Environ.*, vol. 408, n° 18, p. 3746-3762, août 2010, doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.
- [16] W. Mnif, A. I. H. Hassine, A. Bouaziz, A. Bartegi, O. Thomas, et B. Roig, « Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review », *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 8, n° 6, p. 2265-2303, juin 2011, doi: 10.3390/ijerph8062265.
- [17] R. Anckaert et C. Mottes, « Caractérisation des évolutions des concentrations en pesticides dans les eaux de surface du bassin versant du Galion en Martinique : résultats sur quatre années de suivi ». CIRAD, 2019. [En ligne]. Disponible sur:

- https://agritrop.cirad.fr/596071/
- [18] R. M. Lucia *et al.*, « Association of Glyphosate Exposure with Blood DNA Methylation in a Cross-Sectional Study of Postmenopausal Women », *Environ. Health Perspect.*, vol. 130, n° 4, p. 047001, avr. 2022, doi: 10.1289/EHP10174.
- [19] F. Coperchini *et al.*, « In vitro study of glyphosate effects on thyroid cells », *Environ. Pollut.*, vol. 317, p. 120801, janv. 2023, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120801.
- [20] C. Lesseur *et al.*, « Maternal urinary levels of glyphosate during pregnancy and anogenital distance in newborns in a US multicenter pregnancy cohort », *Environ. Pollut.*, vol. 280, p. 117002, juill. 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117002.
- [21] F. Cao, L. Zhu, H. Li, S. Yu, C. Wang, et L. Qiu, « Reproductive toxicity of azoxystrobin to adult zebrafish (*Danio rerio*) », *Environ. Pollut.*, vol. 219, p. 1109-1121, déc. 2016, doi: 10.1016/j.envpol.2016.09.015.
- [22] R. Colpaert *et al.*, « Multi-scale impact of chronic exposure to environmental concentrations of chlordcone in freshwater cnidarian, *Hydra circumcincta* », *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 27, n° 33, p. 41052-41062, nov. 2020, doi: 10.1007/s11356-019-06859-4.
- [23] F. Cao *et al.*, « Parental exposure to azoxystrobin causes developmental effects and disrupts gene expression in F1 embryonic zebrafish (*Danio rerio*) », *Sci. Total Environ.*, vol. 646, p. 595-605, janv. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.331.
- [24] A. Pinsino et V. Matranga, « Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress », *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 49, n° 1, p. 198-205, mars 2015, doi: 10.1016/j.dci.2014.11.013.
- [25] L. Adonin, A. Drozdov, et N. A. Barlev, « Sea Urchin as a Universal Model for Studies of Gene Networks », *Front. Genet.*, vol. 11, p. 627259, janv. 2021, doi: 10.3389/fgene.2020.627259.
- [26] V. D. Vacquier, « Laboratory on sea urchin fertilization », *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 78, n° 8, p. 553-564, août 2011, doi: 10.1002/mrd.21360.
- [27] E. Sodergren *et al.*, « The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* », *Science*, vol. 314, n° 5801, p. 941-952, nov. 2006, doi: 10.1126/science.1133609.
- [28] F. Marlétaz *et al.*, « Analysis of the *P. lividus* sea urchin genome highlights contrasting trends of genomic and regulatory evolution in deuterostomes », *Cell Genomics*, vol. 3, n° 4, p. 100295, avr. 2023, doi: 10.1016/j.xgen.2023.100295.
- [29] M. A. Pombo, Y. Zheng, Z. Fei, G. B. Martin, et H. G. Rosli, « Use of RNA-seq data to identify and validate QRT-PCR reference genes for studying the tomato-*Pseudomonas* pathosystem », *Sci. Rep.*, vol. 7, n° 1, p. 44905, mars 2017, doi: 10.1038/srep44905.
- [30] K. S. Mair, J. Irrgeher, et D. Haluza, « Elucidating the Role of Honey Bees as Biomonitor in Environmental Health Research », *Insects*, vol. 14, n° 11, p. 874, nov. 2023, doi: 10.3390/insects14110874.
- [31] V. Christen, F. Mittner, et K. Fent, « Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*) », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, n° 7, p. 4071-4081, avr. 2016, doi: 10.1021/acs.est.6b00678.
- [32] V. Strobl, M. Albrecht, L. Villamar-Bouza, S. Tosi, P. Neumann, et L. Straub, « The neonicotinoid thiamethoxam impairs male fertility in solitary bees, *Osmia cornuta* », *Environ. Pollut.*, vol. 284, p. 117106, sept. 2021, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117106.
- [33] A. Schroeder *et al.*, « The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements », *BMC Mol. Biol.*, vol. 7, p. 3, janv. 2006, doi: 10.1186/1471-2199-7-3.
- [34] University of Rochester Medical Center, « Interpretation of Bioanalyser Traces ». Medecine of the Highest order. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/research/for-researchers/shared-resource-labs-facilities/rochester-genomics-center/images/Interpretation-of-BioanalyzerPPT\\_071921\\_Final\\_SD\\_EMP.pdf](https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/research/for-researchers/shared-resource-labs-facilities/rochester-genomics-center/images/Interpretation-of-BioanalyzerPPT_071921_Final_SD_EMP.pdf)
- [35] D. Wang et A. Farhana, « Biochemistry, RNA Structure », in *StatPearls*, Treasure

- Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Consulté le: 3 juin 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558999/>
- [36] N. Ruocco *et al.*, « High-quality RNA extraction from the sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 2, p. e0172171, févr. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0172171.
- [37] R. Pérez-Portela et A. Riesgo, « Optimizing preservation protocols to extract high-quality RNA from different tissues of echinoderms for next-generation sequencing », *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 13, n° 5, p. 884-889, sept. 2013, doi: 10.1111/1755-0998.12122.
- [38] « Interpreting bioanalyzer results for RNA collected using Oragene®•RNA ». Oragene®•RNA, 2013. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.dnagenotek.com/us/pdf/PD-WP-017.pdf>
- [39] Bioline | Meridian Bioscience, « Working with RNA: Hints and Tips ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.bioline.com/rna-hints-and-tips>
- [40] P. Hao *et al.*, « Gene expression patterns of sea urchins (*Strongylocentrotus intermedium*) exposed to different combinations of temperature and hypoxia », *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics*, vol. 41, p. 100953, mars 2022, doi: 10.1016/j.cbd.2021.100953.
- [41] M. Chevallier, « Etude de la dégradation biologique et chimique d'un pesticide persistant: la chlordécone ».
- [42] R. M. Cigala, C. De Stefano, A. Irto, P. Lanzafame, G. Papanikolaou, et F. Crea, « Environmental behaviour of a pesticide metabolite, the AMPA. Sequestration of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Al<sup>3+</sup> », *Chemosphere*, vol. 306, p. 135535, nov. 2022, doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135535.
- [43] E. T. Rodrigues, I. Lopes, et M. Â. Pardal, « Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review », *Environ. Int.*, vol. 53, p. 18-28, mars 2013, doi: 10.1016/j.envint.2012.12.005.
- [44] A. N. Gonzalez, N. Ing, et J. Rangel, « Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating », *Apidologie*, vol. 49, n° 2, p. 224-234, avr. 2018, doi: 10.1007/s13592-017-0546-y.
- [45] J. Haas *et al.*, « A toxicogenomics approach reveals characteristics supporting the honey bee (*Apis mellifera* L.) safety profile of the butenolide insecticide flupyradifurone », *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 217, p. 112247, juill. 2021, doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112247.
- [46] Z.-X. Dong *et al.*, « Honeybee (*Apis mellifera*) resistance to deltamethrin exposure by Modulating the gut microbiota and improving immunity », *Environ. Pollut.*, vol. 314, p. 120340, déc. 2022, doi: 10.1016/j.envpol.2022.120340.
- [47] J. Koo, T.-G. Son, S.-Y. Kim, et K.-Y. Lee, « Differential responses of *Apis mellifera* heat shock protein genes to heat shock, flower-thinning formulations, and imidacloprid », *J. Asia-Pac. Entomol.*, vol. 18, n° 3, p. 583-589, sept. 2015, doi: 10.1016/j.aspen.2015.06.011.
- [48] S. Morammazi, « The pattern of HSP70 gene expression, flight activity and temperature in *Apis mellifera* meda colonies », *J. Therm. Biol.*, 2020.

## Annexes

Annexe 1 : Structure chimique des pesticides (ou métabolite) d'intérêts.



Annexe 2 : Contaminants majeurs retrouvés dans les cours d'eau de Martinique en 2021 ainsi que leurs caractéristiques. Crédits : [17]

Contaminants majeurs	Sources de la contamination	Zones les plus contaminées	Evolution de la contamination	Dépassement des Normes de Qualité Environnementale (NQE)
Chlordécone et ses métabolites et HCH (hexachlorocyclohexane)	Insecticides Interdit depuis 1993 pour la chlordécone et 1998 pour le HCH. Contamination diffuse par les sols contaminés en raison de la forte rémanence des molécules.	Nord Atlantique et la Lézarde au centre	Stable depuis le début du suivi (2008) Faible variation interannuelle	Dépassement des NQE sur 22 sites pour la chlordécone et 5 sites pour le HCH
Glyphosate et son métabolite AMPA	Herbicide autorisé Contamination diffuse : utilisation en tant que désherbant dans les cultures.	Sud (François, rivière salée) et centre (Lézarde, rivière Madame)	Diminution du Glyphosate depuis 2018 et augmentation de l'AMPA en 2021	Pas de dépassement des NQE
Azoxystrobine Thiabendazole	Fongicides post récolte de la banane autorisés. Contamination ponctuelle : Utilisation dans les hangars à banane lors des périodes de récolte	Nord et Sud Atlantique (François et Basse pointe)	Diminution forte en 2016 puis progressive jusqu'à 2020. Augmentation en 2021	Pas de dépassement des NQE pour l'azoxystrobine et le thiabendazole.

Annexe 3 : Calendrier théorique de l'exposition n°1 au mois de mai

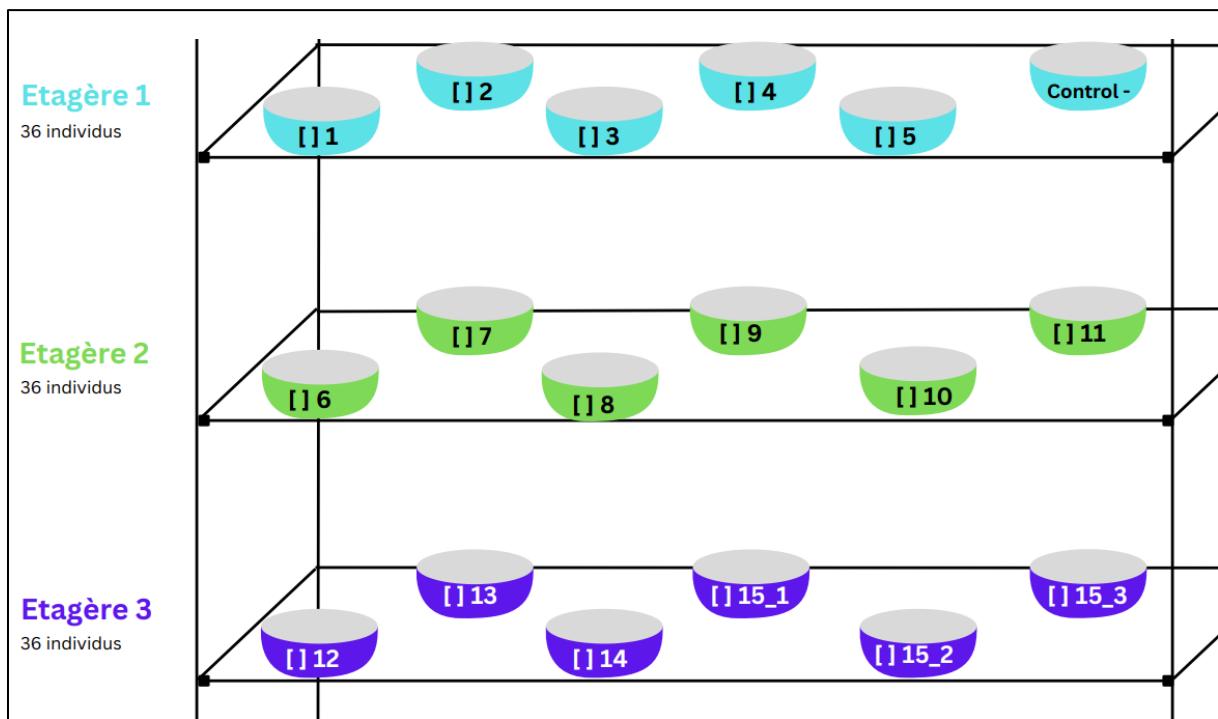
SUN	MON	TUE	WED	THU	FRI	SAT
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14 Etagère 1 exposée	15 Etagère 2 exposée	16 Etagère 3 exposée	17	18
19	20	21 1.) Nettoyage 2.)  Etagère 1	22 1.) Nettoyage 2.)  Etagère 2	23 1.) Nettoyage 2.)  Etagère 3	24	25
26	27	28 Etagère 1 Extraction	29 Etagère 2 Extraction	30 Etagère 3 Extraction	31	

Echantillon d'eau : vérifier les concentrations pesticides à l'aide de la méthode HPLC-UV

Préparation à l'eau salée : 30L par étagère (6 conditions / 5L chacune) 90L l'eau salée au total

Alimentation : 11g de carottes biologiques pour chaque condition une fois ~ 400 grammes de carottes biologiques pour toutes les conditions

Annexe 4 : Plan d'exposition des oursins avec disposition de chaque cristallisoir. Voir (annexe 5) pour les concentrations [] dans chaque milieu.



Annexe 5 : Tableau des concentrations pour caractériser l'effet cocktail avec 16 conditions.

Domaine expérimental

	Nom	Nom abrégé	Unité	Centre du domaine	Pas de variation
Facteur 1	CLD	CLD	µg/L	4.05	3.95
Facteur 2	AMPA	AMPA	µg/L	0.55	0.45
Facteur 3	Azoxystrobine	Azox.	µg/L	0.55	0.45

Plan d'expérimentation

	CLD	AMPA	Azoxystrobine
Expérience 1	0.1	0.1	0.1
Expérience 2	8	0.1	0.1
Expérience 3	0.1	1	0.1
Expérience 4	8	1	0.1
Expérience 5	0.1	0.1	1
Expérience 6	8	0.1	1
Expérience 7	0.1	1	1
Expérience 8	8	1	1
Expérience 9	0.1	0.55	0.55
Expérience 10	8	0.55	0.55
Expérience 11	4.05	0.1	0.55
Expérience 12	4.05	1	0.55
Expérience 13	4.05	0.55	0.1
Expérience 14	4.05	0.55	1
Expérience 15_1	4.05	0.55	0.55
Expérience 15_2	4.05	0.55	0.55
Expérience 15_3	4.05	0.55	0.55

Annexe 6 : Plan de prélèvement et de dissection d'*Apis mellifera*, CONV = Agriculture Conventionnelle, BIO = Agriculture Biologique.

GH	TD	CG	Date de capture	Provenance	Type de culture
1	2	3	19.05.23	L'Aine (Bourg-En-Bresse)	CONV
4	5	6	19.05.23	Aine (Bourg-En-Bresse)	CONV
7	8	9	19.05.23	Aine (Bourg-En-Bresse)	CONV
1'	2'	3'	16.05.23	Oise (Airion)	CONV
4'	5'	6'	23.05.23	Oise (Airion)	<b>BIO</b>
1''	2''	3''	12.07.23	Bretagne (Morlaix)	<b>BIO</b>
4''	5''	6''	31.05.23	Allier (Montluçon)	Champ bleue ts

Annexe 7 : listes des amores pour la qPCR d'*Apis mellifera*, R = reverse primer, F= Forward primer, Tm = Température de demi-dénaturation

Gènes cibles	Amores	Tm(°C)	Sources
<b>Actine</b> (AB023025)	F : TGCCAACACTGTCCTTCTG R : AGAATTGACCCACCAATCCA	35	Christen et al., 2016, 2018, 2020 [31]
<b>Catalase</b> (NM_001178069)	F : GCAGAATACATGGACGGTGT R : GAACAGTCTCGGAAGCTTG	56	
<b>Vitellogénine</b> (NM_001011578)	F : GCAGAATACATGGACGGTGT R : GAACAGTCTCGGAAGCTTG	58	
<b>Acétylcholinestérase</b>	F : CGCGACTATGTGGAATCCGA R : GCGATACTGCATCGAGACCA	60	
<b>SOD1</b> (NM_001178027.1)	F : GGAGAGTACCAATTCCGTGAAG R : CTAATGGGTTGAAATGTGCACC	46	Gonzalez, 2018 [44]
<b>GSTD1</b> (BE844335.1)	F : CAATTGATGAACGGGGAAC R : GCCGTACCGATGTTTCGTA	56	
<b>CYP6AQ1</b> (408383)	F : CGGTGGATTGAAACATCCT R : AGAGCCTCGTGAATCTCAGT	58	Haas et al , 2021 [45]
<b>CYP9Q2</b> (408452)	F : ATGGAAGGAGCACAGGAAC R : ACGTCGTTGGTGTATCTGGT	58	
<b>CYP9Q3</b> (408453)	F : GATGTGCGTCGAGAGTTCC R : CTGTCGGGTCGAATTGTC	60	
<b>Défensine 1</b>	F : TGCCTGCTAACTGTCTCAG R : AATGGCACTTAACCGAAACG	56	Donget al., 2022 [46]
<b>Défensine 2</b>	F : GCAACTACCGCCTTACGTC R : GGGTAACGTGCGACGTTTA	48	
<b>Hsp70</b>	F : CGCCTTCACGGACACAGA R : TTCATTGCGACCTGATTTTG	41	Koo, 2015 [47], Morammazi, 2020 [48]

Annexe 8 : Différents pics retrouvés lors d'un résultat d'analyse du bioanalyseur, crédits : [34]

