



HAL
open science

Evaluation des capacités locomotrices de l'abeille en laboratoire: une méthode qui permet d'identifier des effets sublétaux après exposition à des pyréthri-noïdes et des néonicotinoïdes

Claude Collet, Mercedes Charreton

► To cite this version:

Claude Collet, Mercedes Charreton. Evaluation des capacités locomotrices de l'abeille en laboratoire: une méthode qui permet d'identifier des effets sublétaux après exposition à des pyréthri-noïdes et des néonicotinoïdes. Innovations Agronomiques, 2017, 53, pp.105-109. 10.15454/1.5137720225138914E12 . hal-01594678

HAL Id: hal-01594678

<https://hal.science/hal-01594678>

Submitted on 25 May 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives | 4.0 International License

Evaluation des capacités locomotrices de l'abeille en laboratoire : une méthode qui permet d'identifier des effets sublétaux après exposition à des pyréthrinoïdes et des néonicotinoïdes.

Collet C.¹, Charreton M.¹

¹ INRA UR406 Abeilles et Environnement, Toxicologie environnementale, F-84914 Avignon cedex 9

Correspondance : claud.collet@inra.fr

Résumé

Les méthodes permettant l'évaluation de la toxicité des pesticides pour les abeilles ont tendance à évoluer ces dernières années et ne se cantonnent plus seulement à la détermination de la DL50 (dose provoquant la mort de la moitié des individus). Les récentes recommandations de l'European Food Safety Authority (EFSA) préconisent notamment de développer des tests à même d'identifier des effets comportementaux dans une gamme d'exposition sublétale. Le présent document décrit une méthode qui permet de mesurer les effets délétères des insecticides sur les capacités locomotrices à des niveaux d'exposition qui ne provoquent pas la mort de l'abeille mais qui peuvent compromettre ses chances de survie ou ses performances au sein de la colonie. A l'instar du « test de vol de retour à la ruche des butineuses expérimentées », ce test pourrait dans le futur donner lieu à l'élaboration d'une méthode réglementaire d'évaluation des effets sublétaux des insecticides, après validation *via* un test interlaboratoires. Ce test locomoteur de laboratoire s'inspire des méthodes traditionnellement utilisées sur les rongeurs et à ce titre, il est standardisable, et peut en particulier être transposé sur des abeilles d'âge connu, sur tous les stades adultes. Le test est par exemple ici utilisé avec succès sur des abeilles jeunes, âgée de moins de 24h. .

Mots-clés : Pyréthrinoïde, Néonicotinoïde, Phénylpyrazole, Cyperméthrine, Tiaméthoxam, Fipronil, Locomotion, Déficit, Comportement, Pesticide, Subléthal

Abstract : Locomotor performances of the honey bee measured with a laboratory method. Quantification of sublethal deleterious effects after exposure to either pyrethroids or neonicotinoids.

Methods dedicated to the assessment of pesticides toxicity toward bees tended to improve over the past last years and are not only designed to simply assess LD50 (dose causing mortality of half of individuals). EFSA (European Food Safety Authority) for instance suggested developing new behavioural tests to assess sublethal toxicity. Here, a method allowing to describe locomotor deficits after sublethal exposure to an insecticide is presented (exposure levels thus do not cause death but potentially compromise efficiency and survival inside the colony). This test, just as the "homing flight assay on experienced foragers", could in the future settle the basis for a mandatory test, after validation through an interlaboratory ring test. This lab method was designed based on traditional methods used on rodents and can easily be standardized as well as applied on bees of a known age (on all adult stages). Here, the test was successfully used on young bees, aged less than one day old.

Keywords : Pyrethroid, Neonicotinoid, Phenylpyrazole, Cypermethrin, Thiamethoxam, Fipronil, Locomotion, Deficit, Behaviour, Pesticide, Sublethal

Introduction

Le Carrefour de l'Innovation Agronomique (CIAg) organisé à Avignon sur les abeilles en 2016 est un évènement qui permet de donner accès aux différents acteurs de la société (filiale apicole, institutions, industriels de la protection des plantes) aux récentes avancées en matière de toxicologie. Ces dernières années, la communauté Française de recherche sur les abeilles a notamment produit des travaux à même de fournir des éléments aux décideurs politiques en matière d'écotoxicologie. Ces résultats de recherche ont souvent été permis par l'utilisation ou la conception de nouvelles technologies et méthodologies ainsi que des licences d'exploitation et des brevets d'invention dont certains ont été décrits par ailleurs (Cens et al, 2015 ; Collectif, 2016 ; Collet, 2016 ; Collet et al, 2014 ; Collet et al, 2016 ; Gosselin-Badaroudine et al, 2015). Grâce aux avancées de la recherche sur les abeilles, la toxicologie de l'insecte a d'ailleurs grandement évolué car on ne se limite plus seulement à l'évaluation des paramètres de mortalité (DL50, dose qui provoque la mort de 50% des individus), mais l'on cherche désormais à identifier des effets délétères plus subtils sur le comportement et la physiologie (tout comme en toxicologie humaine). Ces effets peuvent survenir à des doses d'exposition faibles et sont susceptibles *in fine* de compromettre les performances des abeilles dans la colonie, pourtant ils ne sont pas systématiquement requis dans les procédures d'évaluation réglementaires (European Commission, 2013).

Le présent document illustre comment l'élaboration d'une méthode utilisable sur les abeilles (domestiques ou sauvages) peut contribuer à améliorer la perception et la quantification de symptômes d'intoxication consécutifs à l'exposition à une dose qui ne provoque pas la mort de l'individu. Cette approche de laboratoire consiste ici à évaluer les déficits locomoteurs induits chez des abeilles exposées à des doses sublétales d'insecticides appartenant à 3 familles très utilisées dans le monde (pyréthrinoïdes, néonicotinoïdes et phénylpyrazoles).

1. Principe de la méthode

Cette méthode a été décrite dans un article scientifique (Charreton et al, 2015). Brièvement, de jeunes abeilles adultes (premier jour après la sortie de l'alvéole) ont tout d'abord été anesthésiées au CO₂. Plusieurs lots d'abeilles ont ensuite été exposés par contact (dépôt individuel sur le thorax dorsal) à des doses croissantes d'insecticides selon une procédure s'inspirant des méthodes de toxicologie classique (OECD, 1998). La dose retenue pour l'évaluation des déficits locomoteurs est celle qui, 48 heures après exposition, ne provoquait pas de mortalité (DSL48h pour 'dose sublétales à 48h'). Le double de cette dose (2 x DSL48h) provoquait quant à lui une mortalité significativement plus élevée que la mortalité chez des abeilles non exposées. La DSL48h (qui pourrait aussi être qualifiée de DSEO, dose sans effet létal observable) a été déterminée pour un pyréthrinoïde (cyperméthrine), un néonicotinoïde (le thiaméthoxam) et un phénylpyrazole (le fipronil, Figure 1).

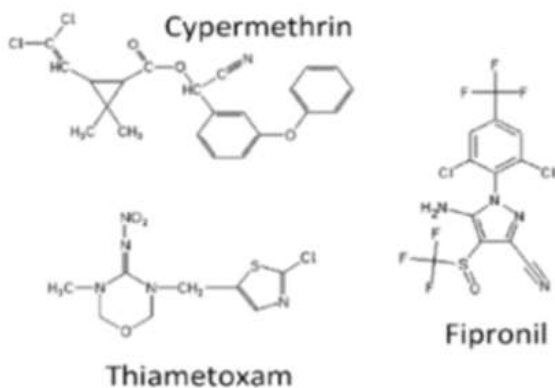


Figure 1 : Formule de trois insecticides largement utilisés dans le monde.

Les abeilles ont ensuite été soumises à un test de locomotion qui consiste à mesurer plusieurs paramètres de déplacement à l'intérieur d'un dispositif clos qui ressemble aux arènes 'open-field' traditionnellement utilisées dans les expériences comportementales sur les rongeurs. Cette arène d'une hauteur et d'une largeur de 30 x 30 cm est disposée verticalement (profondeur 4 cm) et illuminée par le haut, notamment pour permettre la prise de vue. L'arène est placée dans une enceinte obscure permettant notamment de s'affranchir des variations de la lumière du jour. Une caméra pilotée par le logiciel libre VirtualDub permet d'enregistrer des séquences de 180 images à la fréquence de 1 Hz. Ces séquences ont ensuite été analysées de manière semi-automatique *via* un module (plugin) du logiciel libre Image J (Wayne Rasband, NIH, USA) et par des routines (macros) tournant sous le logiciel Excel. Le paramètre 'distance totale parcourue' (en 3 minutes d'observation) s'est avéré suffisant dans le cadre de cette étude pour identifier des déficits locomoteurs.

2. Résultats et discussion

En moyenne, la distance totale parcourue (calculée sur 138 abeilles contrôle) est de 3.2 mètres (Charreton et al, 2015). Les abeilles explorent le centre et les bords du dispositif expérimental (bords en pointillés, Figure 2).

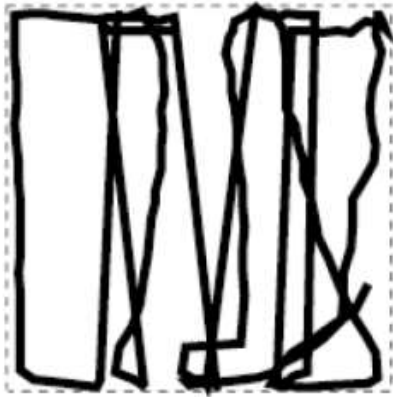


Figure 2 : Reconstruction du parcours individuel effectué en 3 minutes par une abeille dans l'enceinte de locomotion (30 cm de côté).

Six heures après exposition à une dose sublétale DSL48h de cyperméthrine ou de thiaméthoxam (respectivement 2.5 et 3.8 ng/abeille), un déficit locomoteur important est mesuré, avec une distance totale diminuée respectivement de 70 et 59% (Figure 3, la distance relative au contrôle est montrée en gris et le contrôle en noir). En revanche, la méthode n'a pas permis de quantifier de déficit locomoteur 6h après exposition à la DSL48h de fipronil (0.5 ng/bee). Cependant cette dose s'est avérée assez toxique dès 72h (14%, $p < 0.001$) et très toxique à 120h après exposition avec 78% de mortalité (alors que le taux de mortalité dans la modalité contrôle était inférieur à 2%). Les DSL48h de thiaméthoxam et de cyperméthrine n'ont quant à elles pas donné lieu à une mortalité différée en conditions de laboratoire.

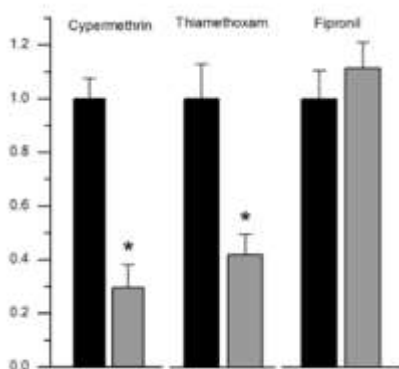


Figure 3 : Quantification des déficits locomoteurs six heures après exposition à une dose sublétale de cyperméthrine ou de thiaméthoxam.

Les résultats obtenus à cette dose sublétales de thiaméthoxam corroborent des résultats récents montrant l'insuccès de retour à la ruche d'une fraction des abeilles butineuses après exposition à ce même insecticide (Henry et al, 2012) et dans laquelle l'hypothèse de la désorientation des abeilles déficientes est la plus vraisemblable. Ici, nous avons identifié chez les jeunes abeilles (naissantes) un déficit locomoteur qui persiste plusieurs heures après exposition (sans toutefois provoquer de mortalité en conditions de laboratoire, même 5 jours après l'exposition). Il serait intéressant de pouvoir observer les conséquences d'un tel déficit sur les tâches normalement effectuées par les jeunes abeilles à l'intérieur de la ruche.

L'avantage de la méthode de laboratoire décrite dans le présent document réside dans le contrôle rigoureux des paramètres de luminosité et de température, ce qui permet de s'affranchir des variations d'effets qui sont parfois observés en fonction de la météo (Henry et al, 2014). Les activités des abeilles naissantes qui seraient exposées dans la ruche à une dose comparable (par exemple par trophallaxie) pourraient être considérablement altérées.

De manière intéressante, le pyréthrianoïde testé ici, la cyperméthrine, induit un déficit locomoteur équivalent au déficit provoqué par le néonicotinoïde. Nous avons d'ailleurs montré que d'autres pyréthrianoïdes : la tétraméthrine et le tau-fluvalinate induisaient, à des doses sublétales, des déficits locomoteurs profonds chez les jeunes abeilles (Charreton et al, 2015). Ces déficits pourraient trouver leur origine dans la neurotoxicité des pyréthrianoïdes, qui agissent sur les neurones olfactifs des antennes (Kadala et al, 2011) et les neurones du cerveau (Kadala et al, 2014), ainsi que nous l'avons démontré *in vitro* sur des cultures cellulaires. Ces déficits locomoteurs pourraient aussi avoir pour origine une action myotoxique, comme cela est suggéré par nos travaux *in vitro* sur l'alléthrine (Collet, 2009). Notre groupe a également confirmé le potentiel neurotoxique des pyréthrianoïdes *in ovo*, en exprimant des protéines d'abeilles (les canaux sodiques, qui sont les cibles de pyréthrianoïdes) dans des oeufs d'amphibien (Gosselin-Badaroudine et al, 2015), une méthode brevetée qui pourrait permettre dans le futur de mieux anticiper la toxicité des pesticides pour les abeilles (Collet, 2016; Collet et al, 2016).

En conclusion, la méthode présentée ici pourrait à l'avenir s'avérer utile pour identifier des déficits locomoteurs induits par des doses faibles d'insecticides qui ne provoquent pas la mort des abeilles, mais qui peuvent diminuer l'efficacité des tâches réalisées par les abeilles dans la ruche.

Références bibliographiques

Cens T., Rousset M., Collet C., Charreton M., Garnery L., Le Conte Y., Chahine M., Sandoz J.C., Charnet P., 2015. Molecular characterization and functional expression of the *Apis mellifera* voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Insect biochemistry and molecular biology* 58: 12-27

Charreton M., Decourtye A., Henry M., Rodet G., Sandoz J.C., Charnet P., Collet C., 2015. A Locomotor Deficit Induced by Sublethal Doses of Pyrethroid and Neonicotinoid Insecticides in the Honeybee *Apis mellifera*. *PLoS One* 10: e0144879

Collectif., 2016. Les brevets et licences de l'Inra PACA - Journées anniversaire des 70 ans de l'INRA. Avignon.

Collet C., 2009. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers from adult domestic honeybee. *Pflugers Arch* 458: 601-612

Collet C., 2016. Vers la mise au point d'un test *in vitro* afin d'évaluer la nocivité des insecticides pour les abeilles - article site web département INRA SPE - <http://www.spe.inra.fr/Toutes-les-actualites/Test-in-vitro-sur-la-nocivite-des-insecticides-pour-les-abeilles>.

Collet C., Cens T., Rousset M., Charnet P., 2014. Bee calcium channel and uses [patent WO2014155021]. In INRA, CNRS (Eds.), Vol. WO2014155021.

Collet C., Chahine M., Gosselin-Badaroudine P., Charney P., Cens T., Rousset M., 2016. Sodium channel subunits of pollinator insects and uses of thereof [patent EPO 14200741.8]. In INRA, CNRS, ULC (Eds.), Vol. EPO 14200741.8.

European Commission, 2013. Règlement UE N° 283/2013 DE LA COMMISSION EUROPEENNE.

Gosselin-Badaroudine P., Moreau A., Delemotte L., Cens T., Collet C., Rousset M., Charney P., Klein M.L., Chahine M., 2015. Characterization of the honeybee AmNav1 channel and tools to assess the toxicity of insecticides. *Sci Rep* 5: 12475

Henry M., Beguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A., 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336: 348-350

Henry M., Bertrand C., Le Feon V., Requier F., Odoux J.F., Aupinel P., Bretagnolle V., Decourtye A., 2014. Pesticide risk assessment in free-ranging bees is weather and landscape dependent. *Nat Commun* 5: 4359

Kadala A., Charreton M., Jakob I., Cens T., Rousset M., Chahine M., Le Conte Y., Charney P., Collet C., 2014. Pyrethroids differentially alter voltage-gated sodium channels from the honeybee central olfactory neurons. *PLoS One* 9: e112194

Kadala A., Charreton M., Jakob I., Le Conte Y., Collet C., 2011. A use-dependent sodium current modification induced by type I pyrethroid insecticides in honeybee antennal olfactory receptor neurons. *Neurotoxicology* 32: 320-330

OECD, 1998. OECD guidelines for the testing of chemicals Number 214, Honeybee acute toxicity tests. 1: 7

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)