



**HAL**  
open science

## **Toxicologie in situ et in ovo : comprendre les mécanismes de toxicité des insecticides, améliorer l'anticipation des risques et trouver des alternatives**

Claude Collet, Thierry Cens, Matthieu Rousset, Mercedes Charreton, Pyabalo Aklesso Kadala, Pascal Gosselin-Badaroudine, Mohamed Chahine, Pierre Charnet

### ► To cite this version:

Claude Collet, Thierry Cens, Matthieu Rousset, Mercedes Charreton, Pyabalo Aklesso Kadala, et al.. Toxicologie in situ et in ovo : comprendre les mécanismes de toxicité des insecticides, améliorer l'anticipation des risques et trouver des alternatives. Innovations Agronomiques, 2017, 53, pp.111-115. 10.15454/1.5137721395860605E12 . hal-01595557

**HAL Id: hal-01595557**

**<https://hal.science/hal-01595557>**

Submitted on 27 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

## Toxicologie *in situ* et *in ovo* : mieux anticiper les risques encourus par les abeilles

Collet C.<sup>1</sup>, Cens T.<sup>2</sup>, Rousset M.<sup>2</sup>, Charreton M.<sup>1</sup>, Kadala A.<sup>1</sup>, Gosselin-Badaroudine P.<sup>3</sup>,  
Chahine M.<sup>3</sup>, Charnet P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA UR406 Abeilles et Environnement, Toxicologie environnementale, Avignon

<sup>2</sup> CNRS UMR 5247 Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier

<sup>3</sup> Institut universitaire en santé mentale, Université Laval, Québec

### Résumé

Des méthodes brevetées récemment pourraient contribuer à améliorer les stratégies utilisées classiquement pour l'évaluation de la toxicité des insecticides chez les abeilles et les autres pollinisateurs. La comparaison des effets des pyréthrinoïdes *in situ* et *in ovo* suggère que la toxicité pourrait dans le futur être déterminée *via* des méthodes *in vitro* plutôt que sur des animaux vivants, à l'instar des principes modernes de pharmacotoxicologie humaine.

**Mots-clés:** Toxicologie *in vitro*, Abeille domestique, Tests réglementaires, Expression hétérologue *in ovo*, Pyréthrinoïdes, Canaux ioniques, Canaux sodiques activés par le potentiel, *Apis mellifera*

**Abstract:** *In situ* and *in ovo* toxicology: a way to better predict risks encountered by pollinators.

Recently patented *in vitro* methods may lead to future improvements of classical toxicological approaches performed to assess the toxicity of insecticides towards honey bees and other pollinators. Here, a comparison of *in situ* and *in ovo* effects of pyrethroids, a widely used class of insecticides, suggests that toxicity could be predicted from *in vitro* experiments rather than on living animals, as it is also the case in modern human pharmacotoxicology.

**Keywords:** *In vitro* toxicology, Honey bee, Mandatory guidelines, *In ovo* heterologous expression, Pyrethroids, Ion channels, Voltage-gated sodium channels, *Apis mellifera*

### Introduction

Grâce aux avancées de la recherche sur les abeilles, la toxicologie de cet insecte a grandement évolué et l'on ne se limite plus seulement à l'évaluation des paramètres de mortalité (DL50, dose de pesticide qui provoque la mort de 50% des individus), mais l'on recherche désormais à identifier des effets délétères plus subtils sur le comportement et la physiologie. Ces effets peuvent survenir à des doses d'exposition faibles et sont susceptibles in fine de compromettre les performances des abeilles dans la colonie. Bien qu'il existe des méthodes permettant de quantifier ces effets sublétaux (Henry et al., 2012; Charreton et al., 2015), les tests ne sont pas systématiquement requis dans les procédures réglementaires d'évaluation des pesticides (European Commission, 2013). Par ailleurs, les méthodes *in vitro* de prédiction précoce du danger font aussi défaut alors même qu'elles permettraient de gagner du temps, d'utiliser un nombre plus parcimonieux d'abeilles, et surtout d'anticiper une toxicité sublétales, trois paramètres importants en matière d'expérimentation animale.

Le Carrefour de l'Innovation Agronomique (CIAg) dédié aux abeilles a permis de regrouper les différents acteurs de l'interface protection des plantes-apiculture (filiale apicole, institutions, industriels de la protection des plantes) et de leur donner accès aux récentes avancées en matière d'apiculture et de toxicologie de l'abeille. La communauté Française de recherche sur les abeilles a récemment produit des travaux qui ont abouti à la conception de nouvelles technologies et méthodologies d'évaluation des risques à même de fournir des éléments de décision en matière d'écotoxicologie aux différents acteurs de la branche.

Le présent document illustre une innovation récente élaborée conjointement par l'Unité Abeilles & Environnement de l'INRA, l'IBMM (CNRS) et l'Université Laval (Québec). Plusieurs brevets ont été déposés, avec un fort potentiel de valorisation dans le domaine de la toxicologie des abeilles et de la lutte raisonnée contre les insectes ravageurs des cultures, respectueuse des abeilles (Collet et al., 2014; Cens et al., 2015 ; Collet et al., 2015 ; Gosselin-Badaroudine et al., 2015 ; Collectif, 2016 ; Collet, 2016).

## 1. Principe des méthodes *in vitro*

Afin de contribuer à identifier plus précocement le danger pour les abeilles, nous avons élaboré une stratégie d'exploration de la toxicité des insecticides, qui couple une approche dite *in situ* (sur des neurones *in vitro*) et une approche *in ovo* (expression des récepteurs neuronaux ciblés par les insecticides dans des oeufs isolés à partir d'amphibien). Les deux approches présentent des avantages complémentaires qui seront discutés ci-après.

### 1.1 *In situ*

La méthode a déjà été décrite dans des publications scientifiques (Collet, 2009 ; Kadala et al., 2011 ; Kadala et al., 2014 ; Collet et al., 2016). En bref, des neurones sont prélevés à partir du cerveau ou des antennes d'abeilles à un stade de développement précoce (nymphe) et sont maintenus plusieurs jours en incubateur, dans un milieu nutritif. L'activité des neurones est ensuite enregistrée grâce à une électrode (capillaire de verre étiré finement et rempli d'une solution physiologique) approchée à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique. Les modifications d'activité suite à la perfusion d'un insecticide en solution sont ainsi mesurées. Cette activité électrique est le reflet du fonctionnement de plusieurs types de protéines appelées canaux ioniques, tels que les canaux sodiques et canaux calciques, les récepteurs nicotiques et les récepteurs GABA. Ces canaux ioniques sont respectivement les cibles des insecticides pyréthrinoïdes (et oxadiazines), des néonicotinoïdes et des phenylpyrazoles. Dans le présent document, nous prendrons l'exemple des canaux sodiques qui produisent des signaux très caractéristiques. Divers paramètres de ces signaux peuvent être mesurés, tels que l'amplitude et des paramètres cinétiques.

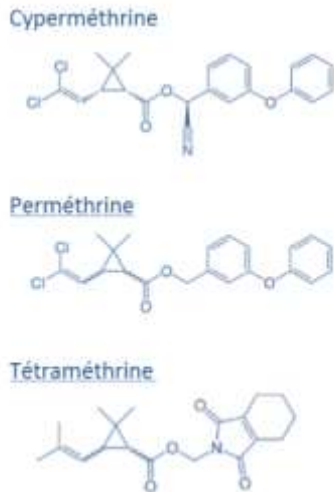
### 1.2 *In ovo*

La méthode a été décrite par ailleurs (Cens et al., 2013 ; Cens et al., 2015 ; Gosselin-Badaroudine et al., 2015; Gosselin-Badaroudine et al., 2016), elle ne sera que brièvement présentée ici. La méthode consiste à exprimer des protéines d'abeilles formant des canaux ioniques à la surface d'un oeuf de xénope (amphibien). Après identification et séquençage des gènes codant les canaux sodiques sur lesquels nous focalisons ici, les acides nucléiques codant pour la protéine (formée de deux sous-unités) sont synthétisés puis micro-injectés dans l'oeuf sous loupe binoculaire. Les oeufs sont ensuite conservés dans des milieux nutritifs stériles en incubateur. La procédure d'enregistrement du signal porté par les canaux sodiques ainsi exprimés est comparable à celle décrite ci-dessus, toutefois, elle nécessite deux microélectrodes et un dispositif d'acquisition spécifique.

## 2. Résultats

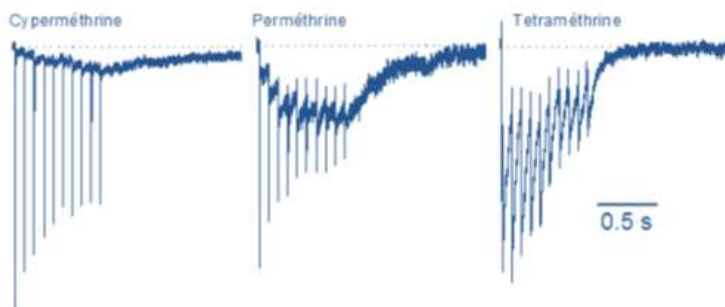
Les propriétés fonctionnelles des canaux sodiques (activation et inactivation), obtenues *in situ* (neurones) et *in ovo* (oeuf de de xénope) sont très similaires et ressemblent fortement à celles décrites chez d'autres espèces d'insectes.

Les effets de plusieurs insecticides ciblant les canaux sodiques ont tout d'abord été étudiés *in situ* (neurones). Trois insecticides de la famille des pyréthrinoïdes, l'une des classes d'insecticides neurotoxiques les plus répandues en France, ont été utilisés : cyperméthrine, tétraméthrine, perméthrine (Figure 1).



**Figure 1** : Trois insecticides de la classe des pyréthrinoïdes.

La cyperméthrine est l'un des pyréthrinoïdes les plus utilisés en agriculture, alors que la perméthrine n'est plus préconisée en France sur les cultures depuis 1989, eu égard à ses propriétés physico-chimiques et toxicologiques, mais demeure autorisée pour le traitement des locaux de stockage et les bâtiments d'élevage, (MATPHYTO, 2014). Ces deux molécules ne diffèrent que par un radical cyanide (-CN). Par ailleurs, la tétraméthrine préconisée pour le traitement des bâtiments d'élevage, représente quant à elle un outil pharmacologique traditionnel utilisé pour étudier le fonctionnement des canaux sodiques (Tatebayashi et Narahashi, 1994). La tétraméthrine comporte le radical vinyl-diméthylcyclopropane de la perméthrine et de la cyperméthrine mais pas le radical phénoxybenzyle. Les signaux électriques neuronaux enregistrés (courants sodiques) peuvent être caractérisés par leur amplitude et leurs cinétiques en réponse à une série de stimulations électriques (Figure 2).



**Figure 2** : Courants ioniques enregistrés dans des neurones exposés à trois pyréthrinoïdes. Une modification subtile du signal neuronal et de l'influx nerveux sous-tend la neurotoxicité de cette classe d'insecticides

Les trois pyréthrinoïdes induisent l'apparition d'un signal lent (persistant), témoin d'une entrée anormalement élevée et prolongée de sodium dans les neurones (*in situ*). Les effets des trois produits sur l'amplitude sont décroissants dans l'ordre tétraméthrine > perméthrine > cyperméthrine, avec un effet

de la tétraméthrine respectivement 9 et 4 fois plus fort qu'avec la cyperméthrine et la perméthrine. En revanche, la cyperméthrine et la perméthrine ralentissent le signal de manière nettement plus importante que la tétraméthrine (0.6 secondes après la stimulation, le signal persistant est respectivement 13 et 10 fois plus fort avec la cyperméthrine et la perméthrine par rapport à la tétraméthrine). Une série d'expériences a également permis de déterminer la concentration de perméthrine induisant 50% de l'effet maximal et qu'on appelle en pharmacologie l'EC50.

Dans l'approche *in ovo*, les modifications obtenues avec la perméthrine étaient similaires à celles obtenues *in situ*. L'EC50 était du même ordre, ce qui suggère que ce système permet d'obtenir une fonctionnalité des canaux sodiques proche de celle obtenue dans les neurones. L'avantage majeur de cette approche réside dans la robustesse des oeufs, qui supportent des protocoles plus longs et intenses que les neurones dans l'approche *in situ*. D'autres pyréthrinoïdes ont aussi été testés dans ce système. Le fenvalérate présente par exemple une EC50 environ 10 fois plus faible que la perméthrine.

## Conclusion

L'approche toxicologique *in ovo* (oeuf d'amphibien) est une méthode qui reproduit le système *in situ* (neurone) tout en présentant l'avantage d'obtenir des signaux durables et robustes. La méthode *in ovo* ne nécessite pas d'expérimentation sur les abeilles, elle est reproductible et standardisable. Ainsi, cette innovation pourrait permettre de fournir un outil de criblage toxicologique sur les insecticides existants ou en cours d'homologation. Un tel outil nécessite la mise en place d'une approche robotisée, grâce à un robot de criblage, tel que ceux qui sont utilisés en pharmacotoxicologie prédictive dans le test hERG. La méthode *in situ*, bien que non adaptée à une approche de criblage, permet de mesurer l'activité des canaux ioniques dans leur environnement natif et constitue donc une étape complémentaire à la méthode *in ovo*.

Les méthodes permettant l'évaluation toxicologique des pesticides sur abeilles sont en perpétuelle évolution. A titre d'exemple, les effets comportementaux et physiologiques à faible dose ne sont quasiment pas pris en compte actuellement dans les tests réglementaires, mais l'EFSA a récemment édité un document de travail qui suggère d'améliorer leur prise en considération. De surcroît, lorsque de nouvelles familles d'insecticides à nouveau mode d'action sont introduites, il apparaît fréquemment des lacunes dans la stratégie d'évaluation du danger (et de l'exposition).

A l'instar de la méthode hERG *-in vitro* utilisée de manière routinière en pharmacotoxicologie humaine, les innovations récemment brevetées pourraient permettre de faire avancer considérablement la problématique 'danger', en prédisant *in vitro* les effets sublétaux liés à la modification du fonctionnement du système nerveux (Collet et al., 2014 ; Collet et al., 2015 ; Charnet et al., 2016a,b). Utilisée dans des conditions rigoureusement contrôlées et dans une logique économe en temps et en animaux vivants respectant « règle des 3 R » de l'expérimentation animale, cette méthode pourrait venir donc s'ajouter aux méthodes de toxicologie classique préconisées par les institutions.

## 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 Ca<sup>2+</sup> channels. *Insect biochemistry and molecular biology* 58:12-27.

Cens T., Rousset M., Collet C., Raymond V., Demares F., Quintavalle A., Bellis M., Le Conte Y., Chahine M., Charnet P., 2013. Characterization of the first honeybee Ca<sup>2+</sup> channel subunit reveals two novel species- and splicing-specific modes of regulation of channel inactivation. *Pflugers Arch* 465:985-996.

Charnet P., Cens T., Rousset M., 2016a. Nicotinic channel subunits of pollinator insects and their uses thereof [patent EP15177390.0].

- Charnet P., Cens T., Rousset M., 2016b. GABA channel subunits of pollinator insects and their uses thereof [patent EP14177633.6].
- 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. In. 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>. In.
- Collet C., Cens T., Rousset M., Charnet P., 2014. Bee calcium channel and uses [patent WO2014155021]. INRA, CNRS, Eds.
- Collet C., Chahine M., Gosselin-Badaroudine P., Charnet P., Cens T., Rousset M., 2015. Sodium channel subunits of pollinator insects and uses of thereof [patent EPO 14200741.8]. INRA, CNRS, ULC, Eds.
- Collet C., Kadala A., Vaissière B., Rousset M., Cens T., Le Conte Y., Chahine M., Thibaud J-B., Charnet P., 2016. Differential Action of Pyrethroids on Honey Bee and Bumble Bee Voltage-Gated Sodium Channels. Biophysical Journal 110:112a.
- European Commission, 2013. Règlement UE No 283/2013 DE LA COMMISSION EUROPEENNE.
- Gosselin-Badaroudine P., Moreau A., Simard L., Cens T., Rousset M., Collet C., Charnet P., Chahine M., 2016. Biophysical characterization of the honeybee DSC1 orthologue reveals a novel voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel subfamily: CaV4. J Gen Physiol 148:133-145.
- Gosselin-Badaroudine P., Moreau A., Delemotte L., Cens T., Collet C., Rousset M., Charnet 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.
- 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.
- Kadala A., Charreton M., Jakob I., Cens T., Rousset M., Chahine M., Le Conte Y., Charnet P., Collet C., 2014. Pyrethroids differentially alter voltage-gated sodium channels from the honeybee central olfactory neurons. PLoS One 9:e112194.
- MATPHYTO, 2014. MATPHYTO - compilation des index phytosanitaires Acta - <http://index-matphyto.univ-lyon1.fr/>
- Tatebayashi H., Narahashi T., 1994. Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. J Pharmacol Exp Ther 270:595-603.

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)