

Réponses moléculaires à l'exposition à différents insecticides chez les abeilles

Laurence VERNIS | laurence.vernis@curie.fr

Inserm, UMR3348 CNRS/Institut Curie, Orsay

Mots clés : Abeille, exposition, pesticides, réponse moléculaire, toxicité

Les abeilles sont des insectes qui jouent un rôle environnemental déterminant, notamment en pollinisant les plantes indigènes et les cultures. Les colonies d'abeilles mellifères *Apis mellifera* ont connu un déclin alarmant au cours des dernières années, que l'activité des apiculteurs ne parvient pas à compenser, et qui pourrait avoir des conséquences graves en termes de production agricole, de sécurité alimentaire, de santé et d'écologie. De nombreux facteurs, dont les pathogènes, la fragmentation de l'habitat, et les pesticides sont responsables de ce phénomène. Parmi les pesticides, les insecticides néonicotinoïdes* par exemple, sont des molécules neurotoxiques utilisées très largement en agriculture, et qui persistent dans l'environnement. Depuis les premières autorisations de ces molécules dans les années 90, des inquiétudes croissantes sont exprimées, notamment en Europe, car elles sont soupçonnées de participer au déclin des abeilles, provoquant leur désorientation et diminuant leur capacité de reproduction. Dans ce contexte, la prise en compte d'éléments nouveaux, notamment de publications scientifiques et de données issues d'études de plein champ récentes, ont amené l'Anses et l'Efsa à émettre des recommandations de restriction d'usage, et à rediscuter les autorisations de mise sur le marché (1). Les effets neurologiques des pesticides observés chez les abeilles sont en effet notables ; cependant les déterminants moléculaires de cette toxicité sont encore mal connus. Les deux articles de cette note analysent les conséquences moléculaires d'une exposition des abeilles à des insecticides variés, à des doses comparables à celles utilisées en agriculture et retrouvées dans l'environnement.

Le premier article analysé s'intéresse aux effets moléculaires de deux insecticides organophosphorés, le chlorpyrifos et le malathion, d'une molécule de la famille des pyréthrinoïdes, la cyperméthrine, et de l'activateur des récepteurs de ryanodine chez les insectes, le chlorantraniliprole.

Le second article décortique le mode d'action moléculaire d'un insecticide néonicotinoïde, l'imidaclopride.

L'exposition des abeilles (*Apis mellifera*) à différentes classes d'insecticides à des concentrations voisines des contaminations environnementales, provoque des réponses moléculaires distinctes

CHRISTEN V. et al. (2017). Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environmental Pollution*, 226 : p.48-59.

Résumé

Les auteurs ont étudié les conséquences sur le plan moléculaire, d'une exposition des abeilles à quatre insecticides appartenant à trois familles chimiques distinctes : le chlorpyrifos et le malathion qui font partie des organophosphorés, la cyperméthrine de la famille des pyréthrinoïdes, et un activateur des récepteurs de ryanodine chez les insectes, le chlorantraniliprole. Ils ont tout d'abord analysé les modifications transcriptionnelles* induites après 24h, 48h et 72h d'exposition des abeilles maintenues dans des cages contenant des concentrations variables de ces composés contenus dans des solutions de glucose. Les cerveaux des abeilles exposées ont ensuite été prélevés et plusieurs transcrits ont été analysés : les transcrits des gènes codant pour les sous-unités des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine alpha 1 et 2 (nAChR α 1, nAChR α 2), de plusieurs gènes du système immunitaire dont la vitellogénine, très

présente chez les abeilles, de gènes impliqués dans la détoxification (cytochromes P450) et dans la voie de réponse au stress du réticulum endoplasmique*. En présence de chacun des quatre insecticides, les résultats montrent une forte modification de l'expression des gènes relatifs au système immunitaire ainsi que du cytochrome P450 (augmentation ou diminution), suggérant des interférences métaboliques et des conséquences négatives sur la santé des abeilles. L'exposition aux quatre molécules s'accompagne d'une diminution de l'expression de nAChR α 1 et nAChR α 2 qui est plus marquée en présence de chlorantraniliprole. L'analyse de l'expression de la vitellogénine a révélé des réponses différentes aux quatre molécules. Induite précocement par le chlorpyrifos et la cyperméthrine, elle est fortement réprimée par le malathion et le chlorantraniliprole. Selon les concentrations de chlorpyrifos et de cyperméthrine, on observe même des effets opposés, soulignant la complexité des réponses métaboliques induites.

Des effets opposés sont également observables pour tous les gènes du stress du réticulum étudié, en réponse aux doses croissantes de chlorantraniliprole. Ce résultat est indicatif d'une perturbation chronique de l'homéostasie calcique qui est très probablement à l'origine de la toxicité de cet insecticide. En conclusion, cette étude montre des réponses transcriptionnelles qui sont variables en nature et en intensité dans le cas d'une exposition aux quatre insecticides testés.

Commentaire

Cette étude est focalisée volontairement sur de faibles doses d'insecticides, de l'ordre du ng/abeille. Pour comparaison, les DL₅₀ du chlorpyrifos (67ng/abeille), du malathion (9200ng/abeille), de la cyperméthrine (64ng/abeille) du chlorantraniliprole (104000ng/abeille) sont 60 à 100000 fois plus élevées que les doses utilisées dans l'étude. Cependant, le chlorpyrifos a été détecté chez des abeilles aux Etats-Unis, à des niveaux de contamination allant jusqu'à 1,1 ng/abeille, et le malathion à des doses jusqu'à 6,1 ng/abeille (2). Des concentrations de cyperméthrine de l'ordre de 4,9 ng/abeille ont également été reportées (3-5). En l'absence de dosage de la contamination par le chlorantraniliprole chez les abeilles, on peut considérer raisonnablement qu'une dose de l'ordre du ng/abeille est pertinente, puisqu'il présente une DL₅₀ beaucoup plus élevée que le chlorpyrifos par exemple, retrouvé comme contaminant à 1.1 ng/abeille. Au cours de l'étude, les doses les plus faibles utilisées, et montrant un effet, sont de 0,06 ng/abeille (chlorpyrifos), 0,9 ng/abeille (malathion), 0,3 ng/abeille (cyperméthrine) et 1,0 ng/abeille (chlorantraniliprole), soit des doses proches ou plus faibles que les contaminations relevées chez des abeilles exposées. Ainsi, aucune mortalité directe n'a été observée au cours des expériences. Cette étude permet de conclure que les différents insecticides testés à des concentrations réalistes induisent des réponses moléculaires distinctes, et possèdent leur propre signature moléculaire. Ce résultat n'est pas surprenant car les molécules testées appartiennent à des familles chimiques différentes. Cependant, ils permettent d'extrapoler de très probables effets synergiques* entre les molécules, voire de la létalité synthétique* en présence de plusieurs molécules. Plusieurs voies qui seront altérées en même temps se traduiront par un cumul d'effets indésirables et par la potentialisation* probable des molécules entre elles.

L'insecticide néonicotinoïde imidaclopride utilisé à des doses sublétales interagit avec la protéine CSP1, impliquée dans la perception chimio-sensorielle chez les abeilles

LI H. et al. (2017). Sublethal doses of neonicotinoid imidacloprid can interact with honey bee chemosensory protein 1 (CSP1) and inhibit its function. *Biochemical and biophysical research communications*, 486 : p.391-397.

Résumé

Au cours de ce travail, les auteurs ont démontré une interaction directe entre l'imidaclopride, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes très utilisé en agriculture, et CSP1 (chemosensory protein1), une protéine du système de perception chimiosensorielle chez les insectes. En plus de leur rôle dans la chimiodétection*, les protéines de la famille CSP interviennent dans la physiologie du développement embryonnaire, de la régénération des membres et des changements comportementaux, ce qui souligne leur grande importance fonctionnelle chez les insectes. Considérée comme un chimiorécepteur essentiel, CSP1 s'exprime fortement dans les antennes des abeilles ouvrières, où elle fixe le β -ionone, un composé aromatique naturel qui permet le repérage des sources de nourriture. Pour étudier l'interaction entre la protéine CSP1 purifiée et l'imidaclopride, les auteurs ont réalisé des spectres de fluorescence et du docking moléculaire qui ont permis de démontrer l'inhibition

fonctionnelle de CSP1 par l'imidaclopride. Les résultats indiquent que CSP1 ne forme pas un complexe stable avec l'imidaclopride, mettant en jeu une liaison de type hydrophobe, à l'inverse de la liaison statique de l'imidaclopride avec un autre récepteur, l'ASP2 (6). Ces résultats suggèrent un vaste spectre d'interaction de l'insecticide avec les récepteurs chez les insectes, et que la structure secondaire de CSP1 est altérée par sa liaison avec l'imidaclopride.

L'inhibition fonctionnelle de CSP1 par l'imidaclopride a été testée en titrant la β -ionone par l'imidaclopride. L'inhibition s'est révélée très efficace, puisque le déplacement de 50% de β -ionone a été réalisé en présence de 2,28-2,53 ng/abeille d'imidaclopride, et qu'à partir de 3,75 ng/abeille, le taux d'inhibition grimpe à 95%. Pour comparaison, la dose sublétale 50 (LC₅₀) d'imidaclopride chez l'abeille, (définie comme la dose à laquelle on observe que 50% des abeilles ont leurs capacités d'apprentissage, d'orientation, de recherche de nourriture ou de soin à leur progéniture altérées) est de 0,15-6,0 ng/abeille (7).

Commentaire

Ce travail montre l'interaction directe entre l'imidaclopride, un insecticide de la famille des néonicotinoïdes, parmi les plus utilisés en agriculture, et la protéine CSP1, un chimiorécepteur essentiel chez les abeilles. Cette étude établit également que l'imidaclopride inhibe la liaison de CSP1 avec son substrat naturel la β -ionone, et ce à des concentrations réalistes, de l'ordre de grandeur des contaminations environnementales. En effet, des concentrations moyennes d'imidaclopride résiduel de 1,2 ng/g ont été mesurées chez les abeilles en France (0,3–11,1) (8). Du fait de cette action inhibitrice, l'imidaclopride perturbe directement la capacité des abeilles à repérer leur nourriture et donc à s'alimenter. Par extrapolation, on peut estimer que des abeilles affaiblies résisteront moins bien aux assauts d'agresseurs, ou à la présence d'autres pesticides de toxicité même modérées pour les abeilles. Il est également important de souligner que la protéine CSP1, membre de la famille CSP, est exprimée à haut niveau chez l'adulte. Si son rôle comme chimiorécepteur est bien caractérisé, d'autres rôles ont pu être suggérés pour CSP1, notamment dans l'immunité, qui pourrait également intervenir dans la toxicité de l'imidaclopride chez les abeilles. En adéquation avec ces données, l'imidaclopride est par ailleurs connu pour affecter l'immunocompétence* chez les abeilles (9).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les deux articles présentés ici s'attachent à identifier chez les abeilles, les effets moléculaires produits par des insecticides appartenant à différentes familles : les organophosphorés (chlorpyrifos et malathion), les pyréthriinoïdes (cyperméthrine), les diamides anthraniliques (chlorantraniliprole) et les néonicotinoïdes (imidaclopride). Les résultats indiquent des cibles différentes selon la famille de molécules considérées. La multiplicité des effets observés avec de faibles niveaux de pesticides, correspondant au niveau de contamination de l'environnement, pourrait ainsi contribuer au déclin observé chez les abeilles, par un cumul d'effets négatifs, potentiellement synergiques. Il est également important de remarquer que tous les insecticides testés ont en commun d'altérer l'immunité des abeilles. Il est donc probable que l'exposition chronique des abeilles aux insecticides accroisse considérablement leur susceptibilité aux pathogènes. Enfin, si la survie des abeilles et les altérations de leurs comportements sociaux sont bien mesurables, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la toxicité des pesticides sont assez peu connus. Ces deux études apportent un éclairage moléculaire à la toxicité induite chez les abeilles après exposition. Elles présentent des éléments factuels permettant de mettre en évidence sans ambiguïté le rôle perturbateur des pesticides dans le métabolisme des abeilles.

GENERAL CONCLUSION

The two studies presented here aim to identify the molecular consequences of bee's exposure to several insecticides from different families: organophosphates (chlorpyrifos and malathion), pyrethrinoids (cypermethrin), ryanoids (chlorantraniliprole) and neonicotinoids (imidacloprid). Results indicate that different molecules have different molecular targets and signatures. This diversity of effects after exposure to low levels of pesticides might contribute to this colony collapse disorder in bees, due to the combination of adverse, potentially synergistic, consequences.

It is also noteworthy that all pesticides tested in the studies are compromising bee's immunity. It is thus probable that chronic exposure of bees to the pesticides might increase their susceptibility to pathogens.

Finally, even though bees' survival or compromised behavior are easily measurable, the molecular mechanisms underlying pesticides toxicity are not well known. These two articles highlight molecular consequences of bees exposure to pesticides and provide objective facts demonstrating a disruptive role of pesticides in bees cellular homeostasis

Lexique

Chimiodétection : Interprétation d'un signal chimique en une information ; ici le récepteur CSP1 fixe la β -ionone, un composé aromatique naturel, qui va signaler la présence de nourriture.

Docking moléculaire : méthode mathématique qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable.

Effet synergique : Effet obtenu par l'action de plusieurs éléments, qui est plus important que la somme des effets de chaque élément pris séparément.

Homéostasie calcique : Processus permettant de maintenir la concentration en calcium intracellulaire à une valeur d'équilibre, favorable au bon fonctionnement des cellules.

Immunocompétence : Capacité de l'organisme à produire une réponse immunitaire après stimulation.

Létalité synthétique : mort cellulaire provoquée par la présence conjointe de deux facteurs, ces deux facteurs ne provoquant par ailleurs pas la mort lorsqu'ils sont présents individuellement.

Modifications transcriptionnelles : changements dans le processus de transcription, c'est-à-dire de génération des ARNs.

Néonicotinoïdes : classe de produits utilisés comme insecticides en agriculture, neuro-toxiques car ciblant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine.

Potentialisation : désigne une situation où la propriété d'une molécule A va augmenter la propriété active d'une molécule B ; l'effet de B est ici potentialisé par A.

Reticulum endoplasmique : organite ou sous-compartiment présent dans les cellules eucaryotes, c'est-à-dire qui possèdent un noyau. Le RE est lié à l'enveloppe nucléaire, et assure de multiples fonctions dont le stockage de molécules, la détoxification, certains métabolismes ioniques.

Stress du reticulum endoplasmique : réponse cellulaire adaptative induite par l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, et qui vise à rétablir l'homéostasie du RE.

Titration : Méthode de détermination de la concentration d'une solution en une espèce donnée. Elle consiste à utiliser une solution de concentration connue (appelée titrant) afin de neutraliser une espèce contenue dans la solution inconnue (appelée analyte ou espèce titrée).

Transcrit : molécule d'ARN issue du processus de transcription.

Publications de référence

1. **ANSES** (2015). AVIS relatif «aux risques que présentent les insecticides à base de substances de la famille des néonicotinoïdes pour les abeilles et les autres pollinisateurs dans le cadre des usages autorisés de produits phytopharmaceutiques» Saisine n° 2015-SA-0142.

2. **Mullin CA.** et al. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* vol.5.

3. **Wiest** et al (2011). Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A.*, 1218 : p.5743-5756.

4. **Sanchez-Bayo F.** et al. (2014). Pesticide residues and bees-- a risk assessment. *PLoS One*, vol. 9.

5. **Hladik ML.** et al. (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Sci Total Environ.*, 542 : p.469-477.

6. **Li H.** et al. (2015). Neonicotinoid insecticide interact with honeybee odorant-binding protein: Implication for olfactory dysfunction. *Int J Biol Macromol.*, 81 : p.624-630.

7. **Schneider CW.** et al. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One*, vol. 7

8. **Blacquiere T.** et al. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21 : p.973-992.

9. **Brandt A.** et al. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol.*, 86 : p.40-47.

Liens d'intérêts

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt