

Effets sublétaux de l'Acétamipride et du Thiamethoxam sur le comportement de l'abeille (*Apis mellifera*)

Abdessalam Kacimi El Hassani, Matthieu Dacher, Vincent Gary, Michel Lambin, Monique Gauthier, Catherine Armengaud

Résumé

Chez les insectes, l'acétamipride et le thiamethoxam sont des néonicotinoïdes qui agissent sur les récepteurs cholinergiques nicotiques. Nous avons recherché des effets sublétaux de ces pesticides sur la sensibilité au sucre, sur la motricité et sur la mémoire des abeilles qui ont été contaminées soit par application topique sur le thorax soit par administration orale. À la suite d'une consommation orale d'acétamipride à $1\mu\text{g}/\text{abeille}$, la sensibilité des abeilles au sucre augmente. L'acétamipride à la dose de $0,1\mu\text{g}/\text{abeille}$, induit une baisse de la mémoire à long terme. Ces effets ne sont pas observés après application topique d'acétamipride. Par ailleurs, à la dose de $0,1$ et $0,5\mu\text{g}/\text{abeille}$, l'acétamipride augmente l'activité locomotrice et la sensibilité à l'eau.

Contrairement à l'acétamipride, le thiamethoxam ne montre aucun effet sur les comportements étudiés dans les conditions testées. Nos résultats suggèrent une vulnérabilité particulière des abeilles à des doses sub-létales de l'acétamipride.

Mots clé : Abeilles, acétamipride, thiamethoxam, mémoire, activité locomotrice, sensibilité au sucre, néonicotinoïdes.

Introduction

Les néonicotinoïdes sont des insecticides largement utilisés en agriculture pour lutter contre les insectes nuisibles, mais peuvent aussi affecter d'autres insectes comme les abeilles. Les néonicotinoïdes nitro-substitués (imidaclopride et thiamethoxam) en application topique sont les plus toxiques pour les abeilles avec des valeurs de DL50 de $18\text{ng}/\text{abeille}$ pour l'imidaclopride et de $30\text{ng}/\text{abeille}$ pour le thiamethoxam. Les néonicotinoïdes cyano-substitués présentent une toxicité beaucoup plus faible avec une DL50 de $7,1\text{ mg}/\text{abeille}$ pour l'acétamipride (Iwasa et al., 2004). Il est largement prouvé que les néonicotinoïdes ciblent les récepteurs cholinergiques nicotiques et agissent comme des agonistes pleins ou partiels (Déglise et al., 2002 ; Tomizawa et Casida, 2003 ; Tan et al., 2007). L'acétylcholine est un neurotransmetteur important dans le cerveau des insectes (Breer, 1987 ; Bicker, 1999) et les sites de liaison de ce neurotransmetteur sont présents dans le cerveau de l'abeille (Kreissl et Bicker, 1989 ; Scheidler et al., 1990). Chez ces insectes, différentes fonctions semblent être dépendantes de la neurotransmission cholinergique (Michelsen et Braun, 1987 ; Cano Lozano et al., 2001 ; Dacher et al., 2005 ; Thany et Gauthier, 2005). Par conséquent, même des doses sub-létales de néonicotinoïdes peuvent affecter le comportement des abeilles.

Il a été précédemment démontré que des abeilles qui ont reçu une dose d'imidaclopride supérieur à $5\text{ng}/\text{abeille}$ présentent une altération de l'activité locomotrice et de la sensibilité au sucre (Lambin et al., 2001). En outre, l'imidaclopride en administration orale ($12\text{ng}/\text{abeille}$) diminue les performances de rétention d'une information mémorisée par les abeilles (Decourtye et al., 2004). En revanche, il a été observé que l'application topique de cette drogue à faible dose ($1,25\text{ ng}/\text{abeille}$) induit une facilitation d'apprentissage simple non associatif et une augmentation de l'activité locomotrice (Armengaud et al., 2002). Outre les

études sur les effets toxiques de l'imidaclopride sur les insectes, on sait peu de choses sur les effets physiologiques et comportementaux de l'acétamipride et du thiamethoxam à des doses sub-létales.

Nous faisons l'hypothèse que l'acétamipride et le thiamethoxam à des doses non toxiques peuvent affecter la fonction gustative, motrice et mnémonique de l'abeille. Il a déjà été démontré que dans des conditions de laboratoire, le réflexe d'extension du proboscis (REP) déclenché par une stimulation des antennes par une solution sucrée pouvait être utilisé comme outil pour évaluer différentes fonctions biologiques qui sont mises en jeu dans le comportement des abeilles. Le test de conditionnement olfactif du REP peut être utilisé pour évaluer les effets sub-létaux des pesticides sur l'apprentissage et la mémoire olfactive chez les abeilles (Lambin et al., 2001 ; Decourtye et al., 2004 ; El hassani et al., 2005). L'intégrité de ces fonctions est nécessaire pour le comportement de butinage. Par exemple, la perception de la solution sucrée est importante pour les abeilles afin de prendre la décision de butiner (Pankiw et Page, 1999). De plus, une association des paramètres floraux (odeur, couleur, forme) à la récompense alimentaire (nectar ou pollen) est réalisée lors du butinage.

Matériel et méthodes

Animaux : Les abeilles butineuses sont récupérées du rucher et maintenues dans des boîtes en plexiglas. Les tests (activité locomotrice, perception d'une solution sucrée et conditionnement olfactif) sont réalisés en trois fois durant la période de Septembre 2003 à Juillet 2004.

Drogues : Acétamipride (99% pureté) et thiamethoxam (97% pureté) (Cluzeau Info labo, Sainte-Foy-La-Grande, France). L'acétamipride ayant été dissout dans l'acétone et le thiamethoxam dans l'acétonitrile, les abeilles ont reçu des solutions contenant respectivement 1% et 10% de solvant pour les contaminations orales et topiques. L'acétamipride est utilisé à des doses de 0,1 ; 0,5 et 1 μ g/abeille et le thiamethoxam est utilisé à des doses de 0,1 ; 0,5 et 1 ng/abeille.

Test de l'activité locomotrice : L'effet de l'acétamipride et du thiamethoxam sur l'activité locomotrice a été étudié 60 min après une application topique unique ou par consommation orale. L'activité locomotrice a été analysée dans un dispositif de (30*30*4cm) éclairé par le haut (Lambin et al., 2001).

La sensibilité au sucre : Dans cette expérience, le REP est utilisé pour tester la sensibilité des abeilles à des concentrations ascendantes de solution de sucrée (CASS). Chaque animal a été testé à deux reprises avec les CASS: 60 min avant et 60min après le traitement. L'effet de la soif sur la sensibilité au sucre a été contrôlé en permettant aux abeilles de boire de l'eau *ad libitum* 1h avant chaque présentation de CASS. Les concentrations des solutions sucrées sont de 0,1%, 0,3%, 1%, 3%, 10% et 30% (poids/volume).

Pour l'évaluation de REP à l'eau toutes les abeilles ont été prises en compte. Le REP à l'eau a été testé 3 min avant de tester le REP au sucre en touchant l'antenne de l'abeille avec une goutte d'eau avant chaque CASS.

Conditionnement olfactif du REP : 3h de jeûne sont nécessaires pour renforcer l'état de motivation des animaux. Les traitements par voie orale ou topique ont été réalisés 3h avant le conditionnement olfactif. Un paradigme avec 5 essais était utilisé avec un intervalle inter-essai de 1 min. Les abeilles ont été conditionnées à associer le stimulus conditionné (SC), représenté par une odeur de café avec un stimulus inconditionnel (SI), représenté par une goutte de solution sucrée (40% p/v). Au cours des tests de rappel, le CS a été présenté seul 1h, 24h et 48h après la session d'apprentissage.

Résultats

Activité locomotrice : L'acétamipride augmente la longueur de marche totale dans le dispositif, 60 min après le traitement (figure 1A). Une différence significative a été révélée entre les abeilles contrôles et les abeilles traitées (0,1 et 0,5 $\mu\text{g}/\text{abeille}$) par contamination topique. En revanche, après une administration orale ou une application topique de thiamethoxam, l'activité locomotrice des animaux n'a pas été significativement modifiée par rapport aux abeilles contrôles (figure 1B).

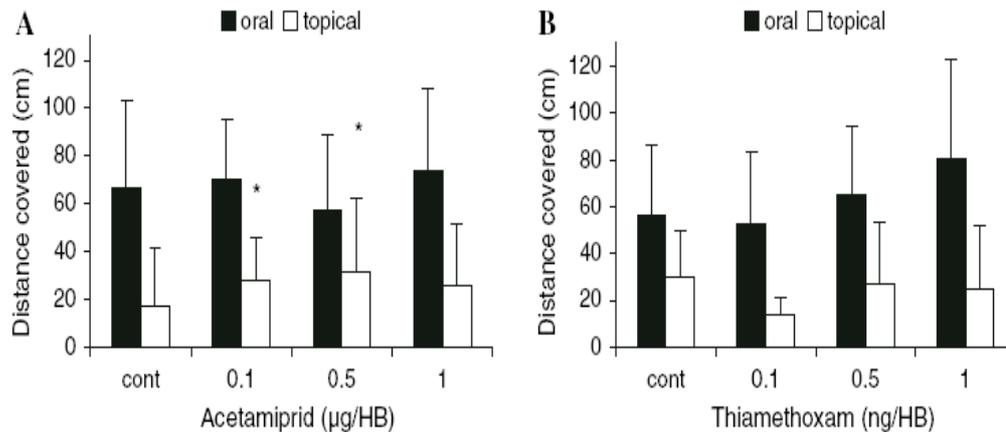


Fig.1 Moyennes (+ES) des distances parcourues par les abeilles traitées par l'acétamipride (A) et le thiamethoxam (B).

REP au sucre : Dans les expériences menées avec l'acétamipride par application topique, la sensibilité au sucre du groupe contrôle (10% d'acétone) baisse significativement. Par contre, le groupe d'abeilles traitées avec de l'acétamipride à 1 $\mu\text{g}/\text{abeille}$, présente un même taux de réponse au premier et au deuxième CASS (Fig. 1A).

Les abeilles traitées avec du thiamethoxam présentent des réponses aux solutions sucrées similaires avant et après le traitement (Résultats non montrés).

REP à l'eau : Les données ont été présentées sous forme d'un indice de réponse à l'eau (WRI). (Fig. 2B). Les valeurs positives indiquent que le traitement induit une augmentation de la réactivité à l'eau lorsque les abeilles reçoivent de l'acétamipride en application topique. Cet effet de l'acétamipride n'a pas été constaté après traitement par voie orale et aucune modification significative de la réponse à l'eau n'est observée avec le thiamethoxam.

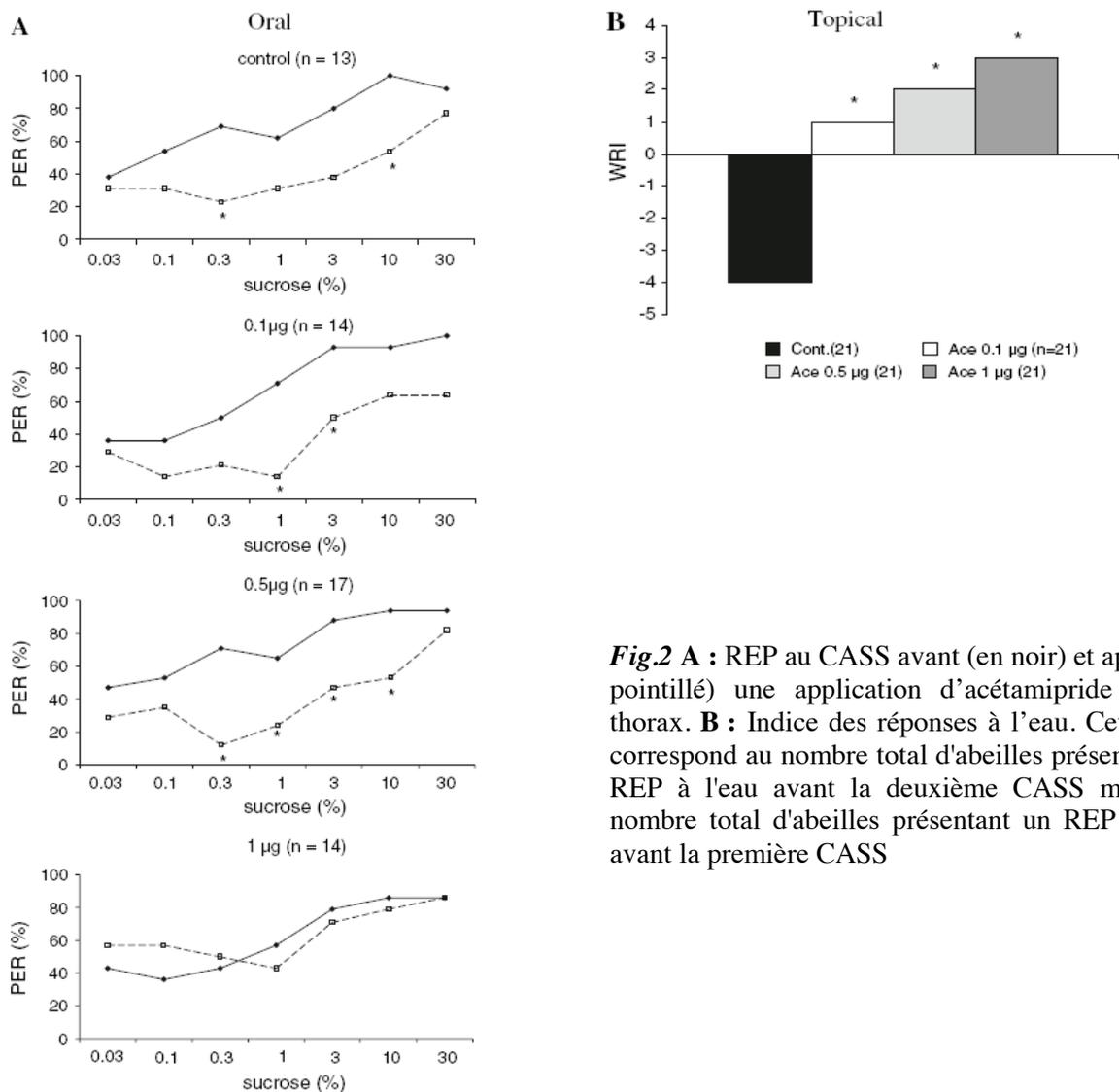


Fig.2 A : REP au CASS avant (en noir) et après (en pointillé) une application d'acétamipride sur le thorax. **B** : Indice des réponses à l'eau. Cet indice correspond au nombre total d'abeilles présentant un REP à l'eau avant la deuxième CASS moins le nombre total d'abeilles présentant un REP à l'eau avant la première CASS

Apprentissage et mémoire olfactive : L'administration orale d'acétamipride n'induit aucun effet sur les performances d'apprentissage (Fig. 3A). Toutefois, le pourcentage de REP testé 48h après d'apprentissage est nettement plus faible dans le groupe traité à 0,1µg/abeille que dans le groupe contrôle (Fig. 3B). Les performances des animaux qui ont reçu 0,5µg et 1,0µg ne sont pas différentes des autres groupes.

Le traitement topique avec de l'acétamipride n'induit aucun effet significatif sur l'apprentissage et la mémoire.

Les performances des animaux qui ont consommé du thiamethoxam oralement ne sont pas significativement différentes de celles des contrôles.

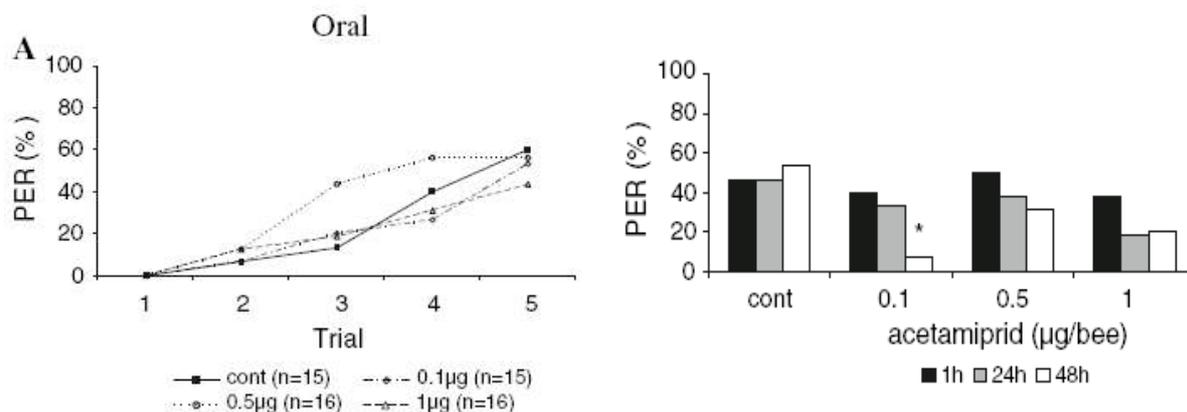


Fig. 3 Apprentissage olfactif (A) et la mémoire des abeilles après absorption d'acétamipride.

Discussion

Nous avons recherché des effets sublétaux d'un traitement aigu d'acétamipride ou de thiamethoxam sur la physiologie et le comportement de l'abeille. Les doses de pesticides qui ont été utilisées sont de l'ordre de LD50/100 à LD50/10. Vingt-quatre heures et 48 h après la contamination par voie orale ou topique, la mortalité dans les groupes acétamipride et thiamethoxam était identique à celle du groupe contrôle. La conclusion majeure de cette étude est que la physiologie et le comportement des abeilles sont plus affectés par l'acétamipride que par le thiamethoxam. En effet, contrairement à l'acétamipride, le thiamethoxam n'induit aucun effet significatif sur l'activité locomotrice, sur le REP au sucre et à l'eau ou sur l'apprentissage et la mémoire.

L'activité locomotrice de l'abeille a été stimulée par l'acétamipride à des doses de 0,1 et 0,5 µg/abeille, alors que le déplacement n'a pas été affecté par la dose de 1 µg/abeille. Ce résultat confirme celui qui a été obtenu avec l'imidaclopride (Lambin et al. 2001). De plus, il semble que la dose de 1 µg / abeille augmente la sensibilité au sucre. Le REP à l'eau a augmenté d'une manière dose dépendante après l'application topique d'acétamipride. Les expériences sur l'apprentissage indiquent que le traitement par voie orale avec de l'acétamipride (0,1 µg/abeille = LD50/100) induit une baisse de la mémoire à long terme. L'acétamipride et l'imidaclopride sont des néonicotinoïdes agonistes des récepteurs de l'ACh (Tan et al. 2007) et partagent le même site de liaison (Kayser et al. 2004). Le traitement oral des abeilles à l'imidaclopride (12 ng/abeille = LD50/2,5) réduit la mémoire olfactive. Des doses plus faibles n'ont pas d'effet sur l'apprentissage et la mémoire (Decourtye et al. 2004). Une facilitation de la mémoire non associative a également été induite par l'imidaclopride (Lambin et al. 2001; Guez et al. 2003 ; Thany et Gauthier 2005). Plusieurs études montrent les effets différentiels des antagonistes nicotiques sur les processus de mémoire (Cano Lozano et al. 1996; Lozano Cano et al. 2001; Dacher et al. 2005, Gauthier et al. 2006). Ces résultats soulignent l'existence de différents sous-types de récepteurs nicotiques, qui pourraient être affectés différemment par les néonicotinoïdes.

L'effet de l'acétamipride sur le comportement n'est pas dose/réponse. En effet, des doses d'acétamipride intermédiaires (0,1 ou 0,5 µg/abeille) affectent l'apprentissage et l'activité locomotrice, alors que la dose la plus élevée (1 µg/abeille) n'a pas eu d'effet. Une explication de ce phénomène pourrait être l'existence de deux récepteurs pour l'acétamipride, comme cela a été suggéré pour l'imidaclopride (Nauen et al. 2001; Guez et al. 2003). Dans la présente étude, le thiamethoxam ne provoque aucun effet sur le comportement des abeilles. Ces résultats sont en accord avec les enregistrements en patch-clamp (Tan et al. 2007). Dans cette

étude, contrairement aux autres néonicotinoïdes testés, le thiamethoxam n'a pas évoqué de courant entrant et n'a pas montré d'interaction avec les autres néonicotinoïdes sur nAChRs (Tan et al. 2007).

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet (ONIFLHOR, 407), ministère français de l'agriculture.

Bibliographie

Armengaud C, Lambin M, Gauthier M (2002) Effects of imidacloprid on the neural processes of memory in honeybee. In Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals, Devillers J. and Pham-Delègue M.H., p 85-100.

Bicker G (1999) Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee, *Microsc Res Tech* 45:174-83.

Breer H (1987) Neurochemical aspects of cholinergic synapses in the insect brain. In, *Arthropod brain. Its evolution, development, structure and functions*, (Gupta, A.P., Ed.), Wiley, New York, p 415-437.

Cano Lozano V, Armengaud C, Gauthier M (2001) Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee, *J Comp Physiol A* 187(4):249-54.

Cano Lozano V, Bonnard E, Gauthier M, Richard D (1996) Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee, *Behav Brain Res* 81(1-2):215-22.

Dacher M, Lagarrigue A, Gauthier M (2005) Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics, *Neuroscience* 130: 37-50.

Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, Pham-Delegue MH (2004) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.) *Pest Biochem Physiol* 78:83-92.

Déglise P, Grunewald B, Gauthier M (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci Lett* 321:13-16.

El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C (2005) Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 82:30-39.

Gauthier M, Dacher M, Thany SH, Niggebrugge C, Deglise P, Kljucovic P, Armengaud C, Grunewald B (2006) Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 86(2):164-74.

Guez D, Belzunces LP, Maleszka R (2003) Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav* 75:217-22.

Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe MR (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23:371-378.

Kayser H, Lee C, Decock A, Baur M, Haettenschwiler J, Maienfisch P (2004) Comparative analysis of neonicotinoid binding to insect membranes: I. A structure-activity study of the mode of [3H]imidacloprid displacement in *Myzus persicae* and *Aphis craccivora*. *Pest Manag Sci* 60:945-958.

Kreissl S, Bicker G (1989) Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *J Comp Neuro*. 286:71-84.

Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol* 4:129-134.

Michelsen DB, Braun GH (1987) Circling behavior in honey bees. *Brain Res* 421(1-2):14-20.

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U, Schmuck R (2001) Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 57, 577-86.

Pankiw T, Page RE (1999) The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 185:207-213.

Scheidler A, Kaulen P, Brüning G, Erber J (1990) Quantitative autoradiographic localization of I⁻-bungarotoxin binding sites in the honeybee brain. *Brain Res* 534:332-335.

Tan J, Galligan JJ, Hollingworth RM (2007) Agonist actions of neonicotinoids 410 on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons, *Neurotoxicology*

Thany SH, Gauthier M (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res* 1039:216-219.

Tomizawa M, Casida JE (2003) Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Re Entomol* 48:339-364.