

Effets des insecticides sur le développement des glandes hypopharyngiennes chez l'abeille domestique adulte après une exposition au stade larvaire.

P. AUPINEL*, D. FORTINI*, A. DECOURTYE**, J. DEVILLERS***

*Unité expérimentale d'entomologie, INRA, Le Magneraud, BP52 17700 SURGERES

**ACTA, UMT PrADE, INRA - UMR 406 Abeilles et environnement, Site AgroParc, 84914 Avignon cedex 9

***CTIS, 3 chemin de la gravière, 69140 Rillieux La Pape

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Diapositive 1

PA1

intro :

pesticides risk assessment generally requires successive tiers from laboratory as a first screening to semi field and field situations which are closer to natural situations.

P AUPINEL; 04/10/2005

Mode de contamination larvaire :



*Collecte de nectar
ou pollen par les butineuses*

*Transfert dans la
colonie pour stockage*



*Reprise par les
nourrices pour
le nourrissage
des larves*

**Risque d'intoxication
avec du nectar ou du
pollen contaminés**

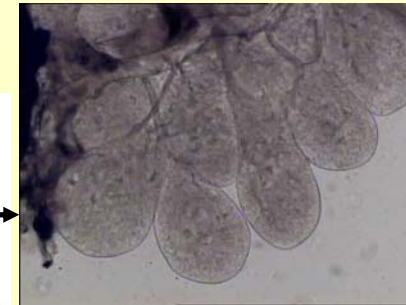
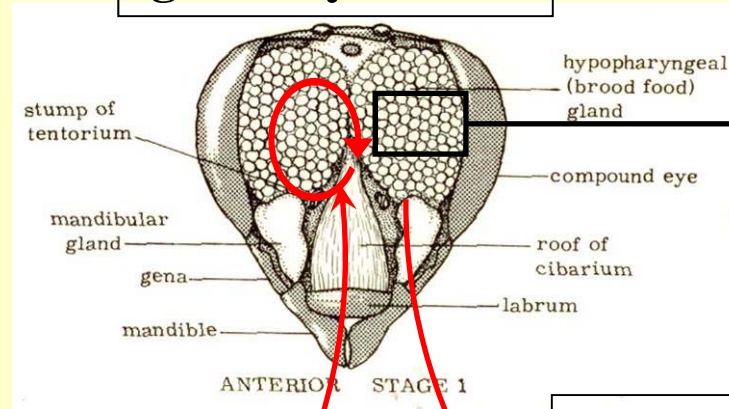


Effets d'une exposition au stade larvaire à un pesticides

- Effets létaux à court terme : DL50 à 48h du diméthoate, (Aupinel et al., 2007)*
- Effets sublétaux à court terme : apoptose de certains tissus glandes salivaires, jabot, ovaires (A. Gregorc, J.D. Ellis, 2011)*
- Effets létaux différés : inhibition de la mue imaginale par le fenoxycarbe, (Aupinel et al., 2007)*
- Effets sublétaux différés : ?*

Localisation et rôle des glandes hypopharyngiennes (GHP)

Elaboration de la gelée royale



Ingestion de pollen par les nourrices



Sécrétion de gelée royale et nourrissage des larves : apport de protéines



Facteurs de développement des GHP:

Age des ouvrières (Desyn et al, 2005 ; Huang et al, 1989)

Alimentation en protéines (Hrassnig et al, 1998 ;Pernel et al, 2000)

Présence de couvain (Hrassnig et al, 1998 ; Huang et al, 1989)

Facteurs d'inhibition :

*Exposition au
stade adulte*

*(ouvrière âgée
de 1 à 10 jours)*

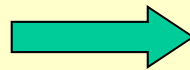
**Inhibiteurs de protéases (Babendrier et al, 2005 ;
Sagili et al, 2005, 2007)**

Insecticides (Diflubenzuron) (Gupta et Chandel, 1995)

Question abordée dans cette étude :

Une exposition à un polluant au stade larvaire peut-elle provoquer une inhibition du développement des GHP ?

Exposition au stade larvaire



Effet sublétaI différé chez l'adulte

Méthodes utilisées

Elevage larvaire in vitro

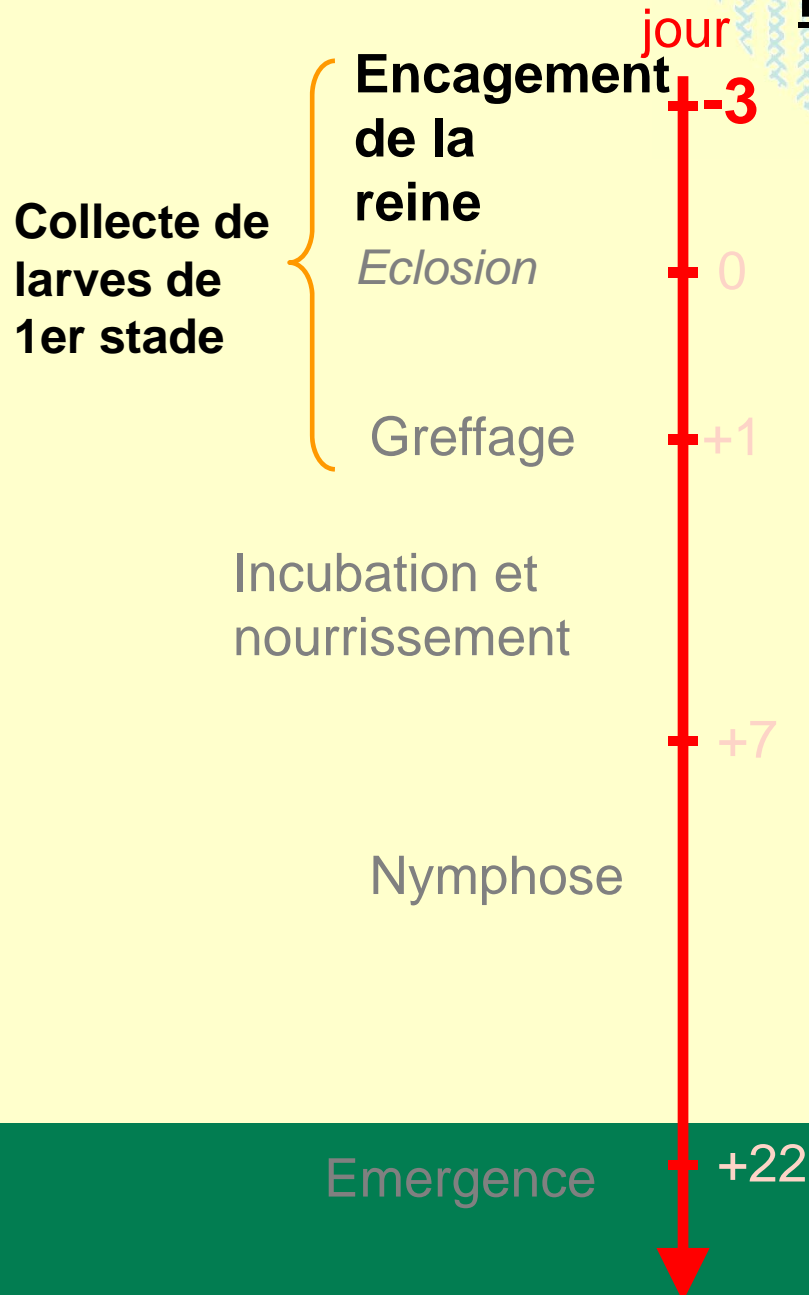
Aupinel, P.; Fortini, D.; Dufour, H.; Tasei, J. N.; Michaud, B.; Odoux, J. F.; Pham-Delegue, M. H.,

Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera*

larvae. *Bulletin of Insectology*, 2005, 58 (2) : 107-111



PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



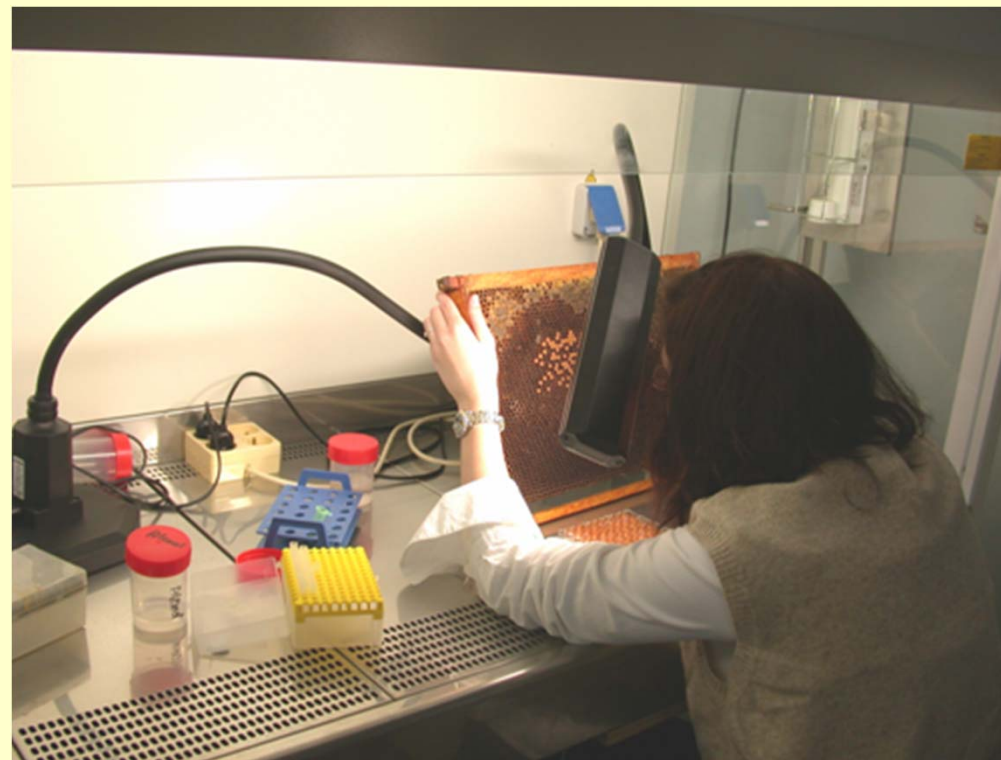
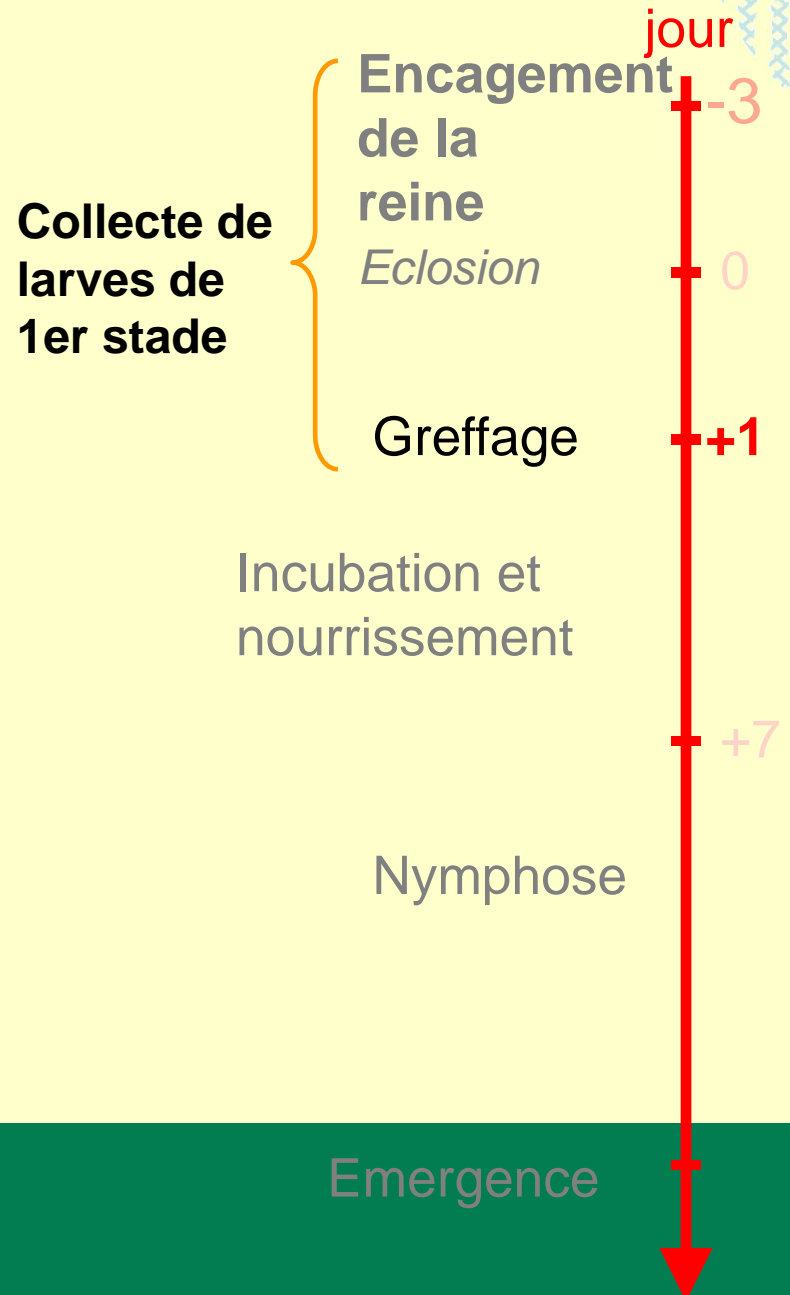
Diapositive 8

PA3

the first step of the rearing method consists in preparing a colony and its queen for collecting homogeneous larvae. In this purpose, we use an excluder cage in which we place a frame and we encage the queen for thirty six hours into the colony. After removing the queen, the frame is left into the cage and into the colony till the grafting operation

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



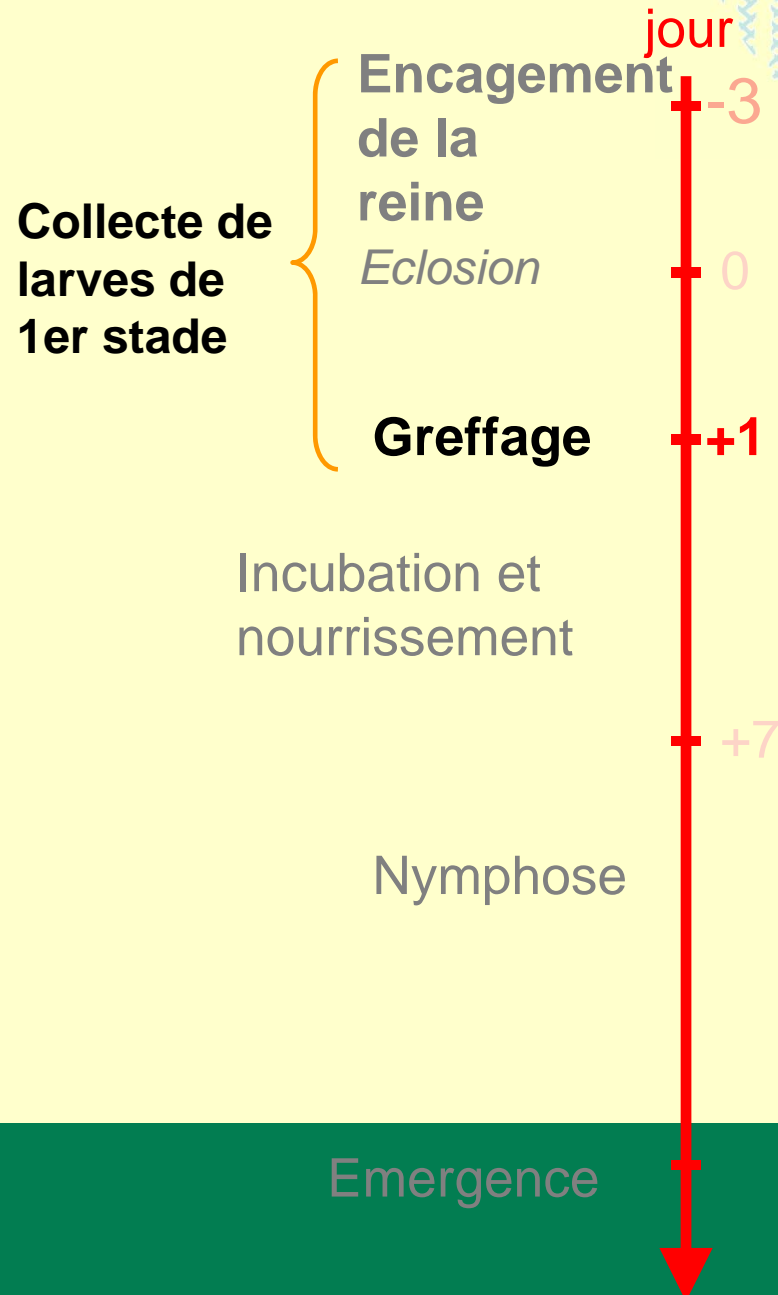
Diapositive 9

PA4

For this step, the frame containing the new hatched larvae is brought into the laboratory in order to transfer 1st instar larvae from the com into the I rearing plates. We use for this operation a thin brush. The larvae are transferred into plastic grating cupulae used in bee keeping for queen rearing, first disinfected in a MBC solution, and having received twenty microliter of diet. Each cupula is put into a well of a forty eight wells cellular culture plate in the bottom of which is placed a piece of dental roll saturated with MBC solution in order to avoid fungi development. To prevent eventual microbiological infestation the grafting operation is realised in a laminar airflow cabinet.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



Collecte de larves de 1er stade



Emergence

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



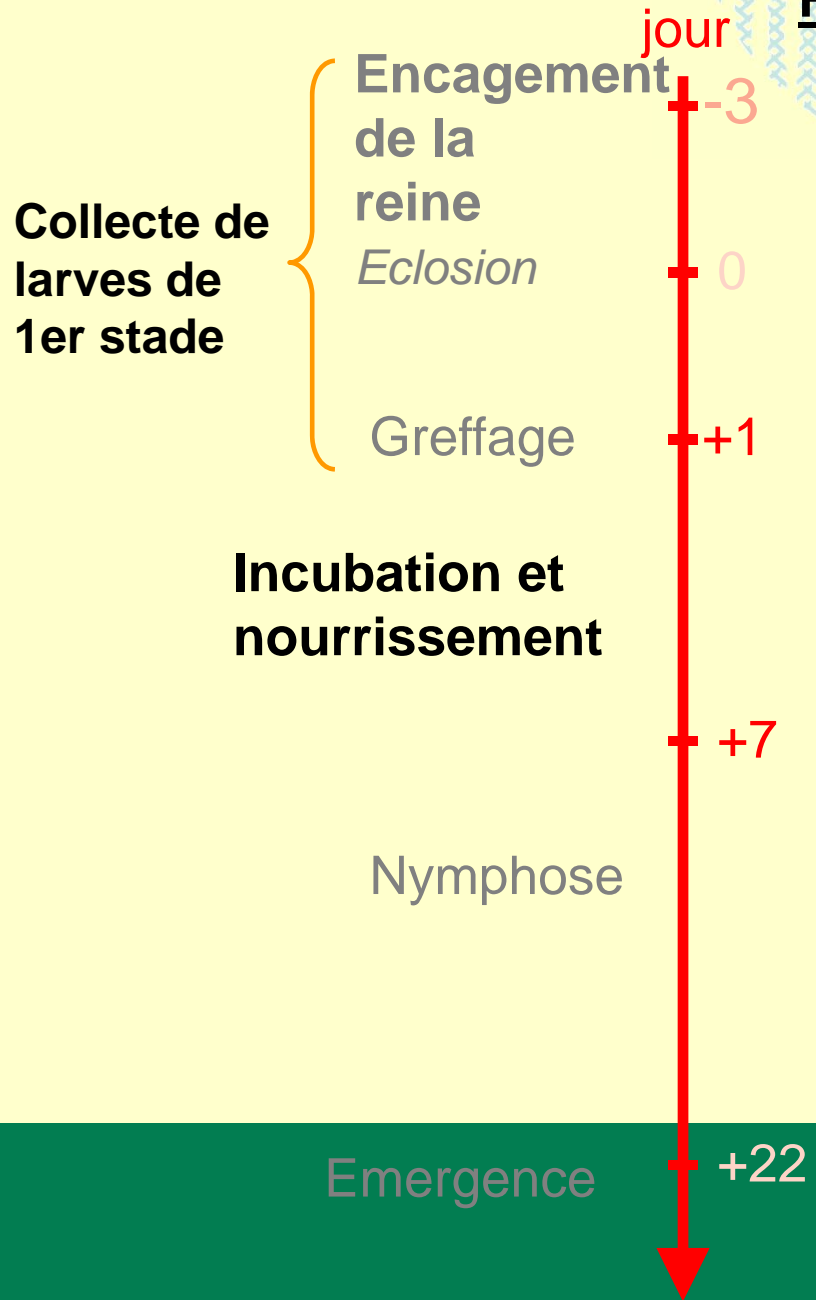
Diapositive 10

PA5

For this step, the frame containing the new hatched larvae is brought into the laboratory in order to transfer 1st instar larvae from the com into the I rearing plates. We use for this operation a thin brush. The larvae are transferred into plastic grating cupulae used in bee keeping for queen rearing, first disinfected in a MBC solution, and having received twenty microliter of diet. Each cupula is put into a well of a forty eight wells cellular culture plate in the bottom of which is placed a piece of dental roll saturated with MBC solution in order to avoid fungi development. To prevent eventual microbiological infestation the grafting operation is realised in a laminar airflow cabinet.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



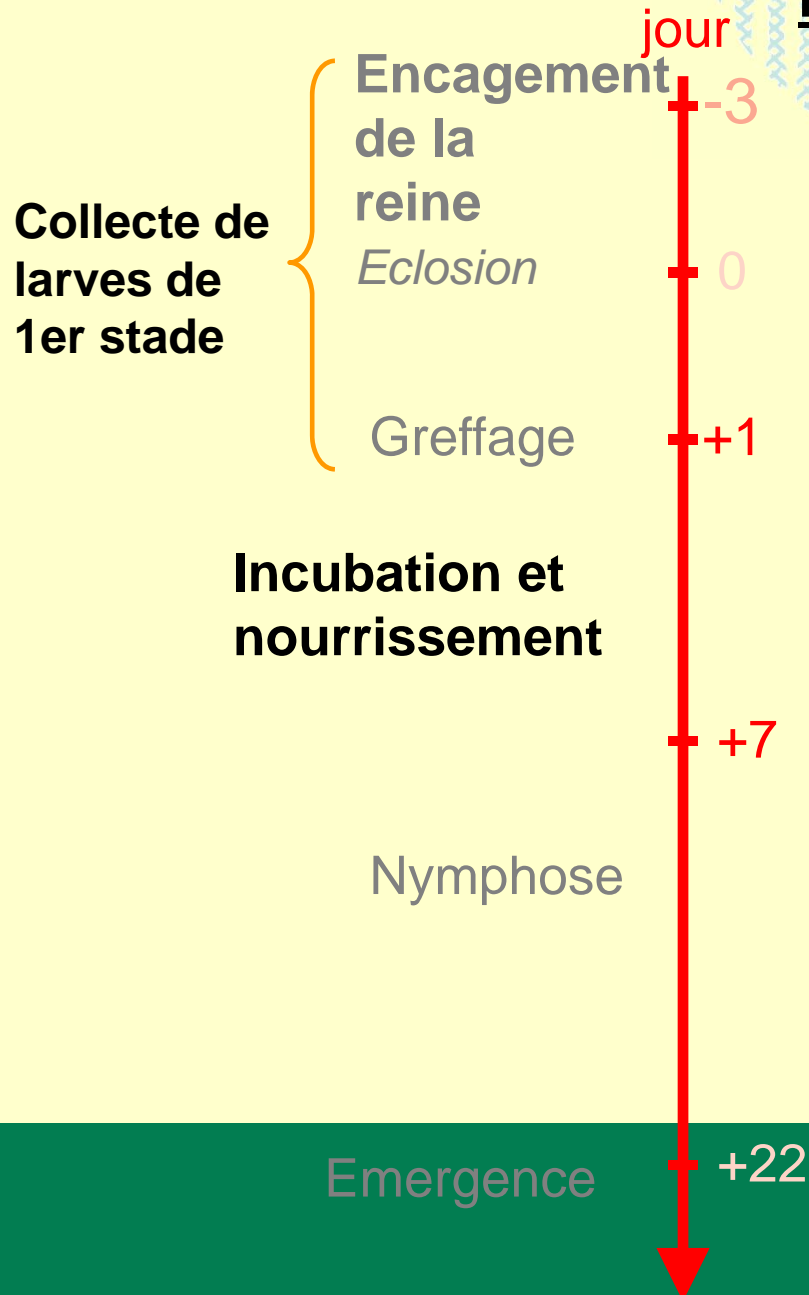
Diapositive 11

PA6

From the first to the seventh day, the larvae are placed into an incubator at 33°C and 98 % of relative humidity. Once a day, each plate is removed from the incubator for feeding with a micro pipet. Here you can see 2 days larvae, and here 6 days larvae.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



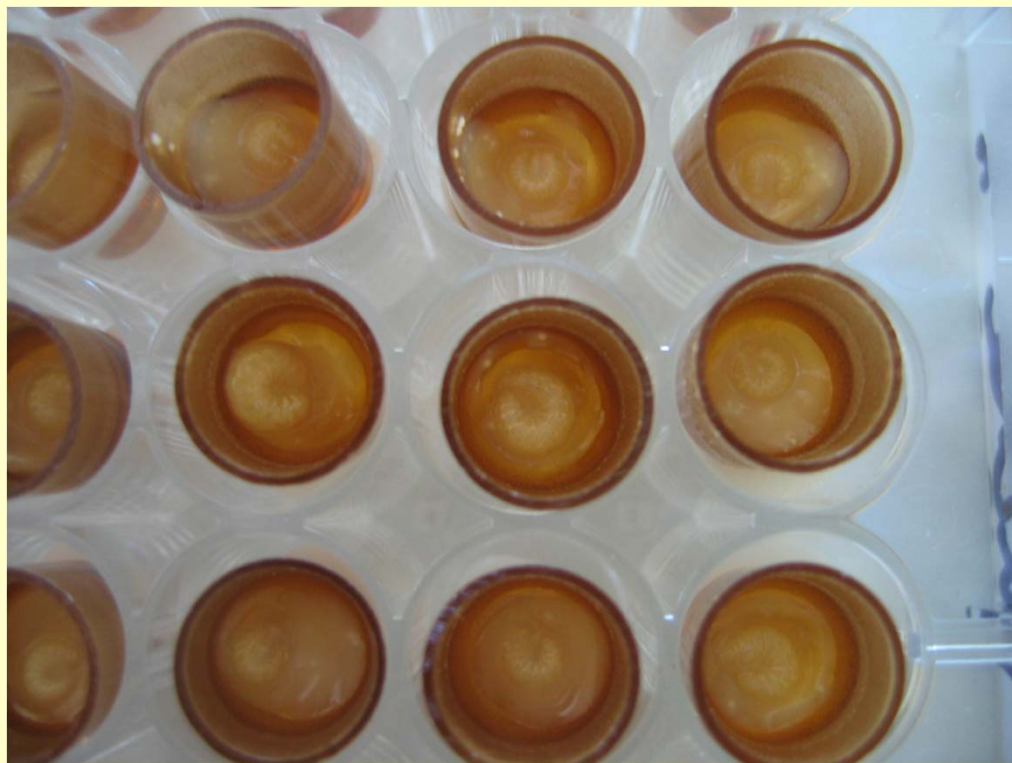
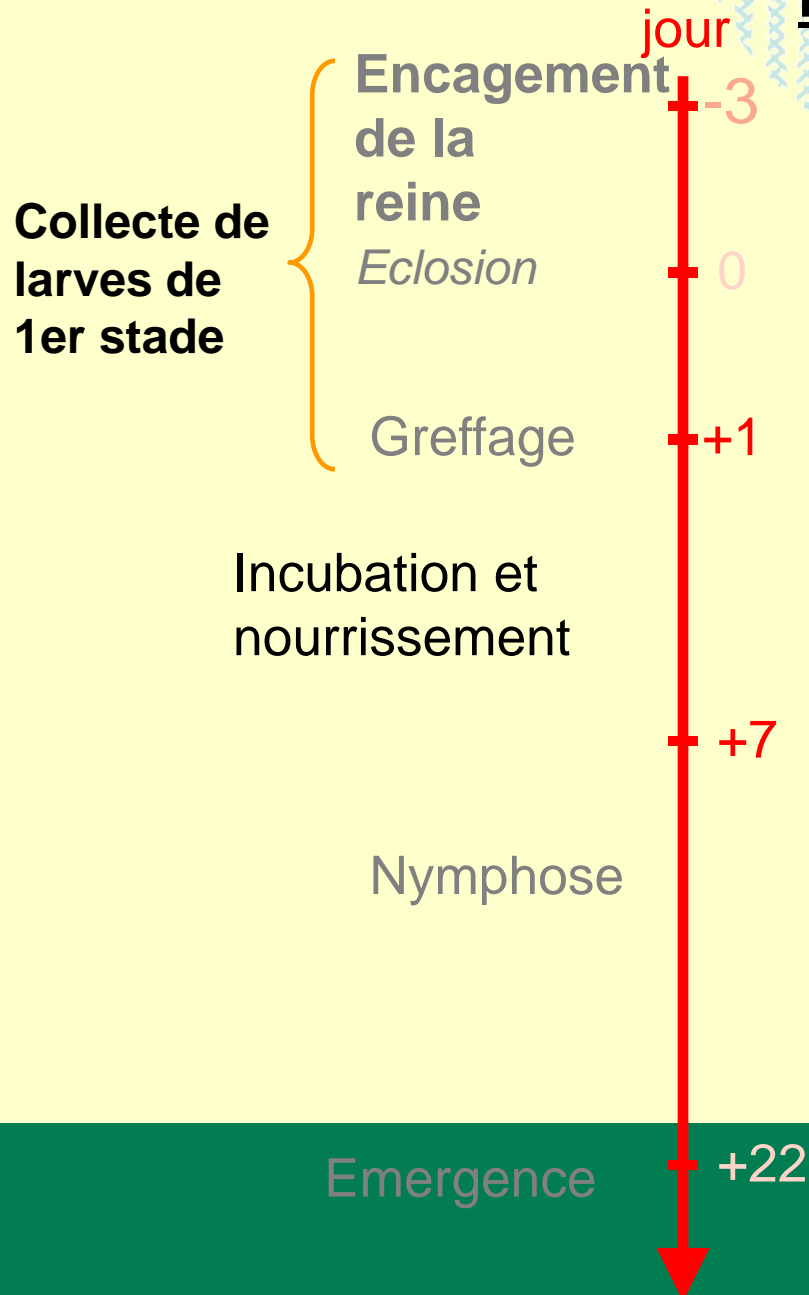
Diapositive 12

PA7

From the first to the seventh day, the larvae are placed into an incubator at 33°C and 98 % of relative humidity. Once a day, each plate is removed from the incubator for feeding with a micro pipet. Here you can see 2 days larvae, and here 6 days larvae.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



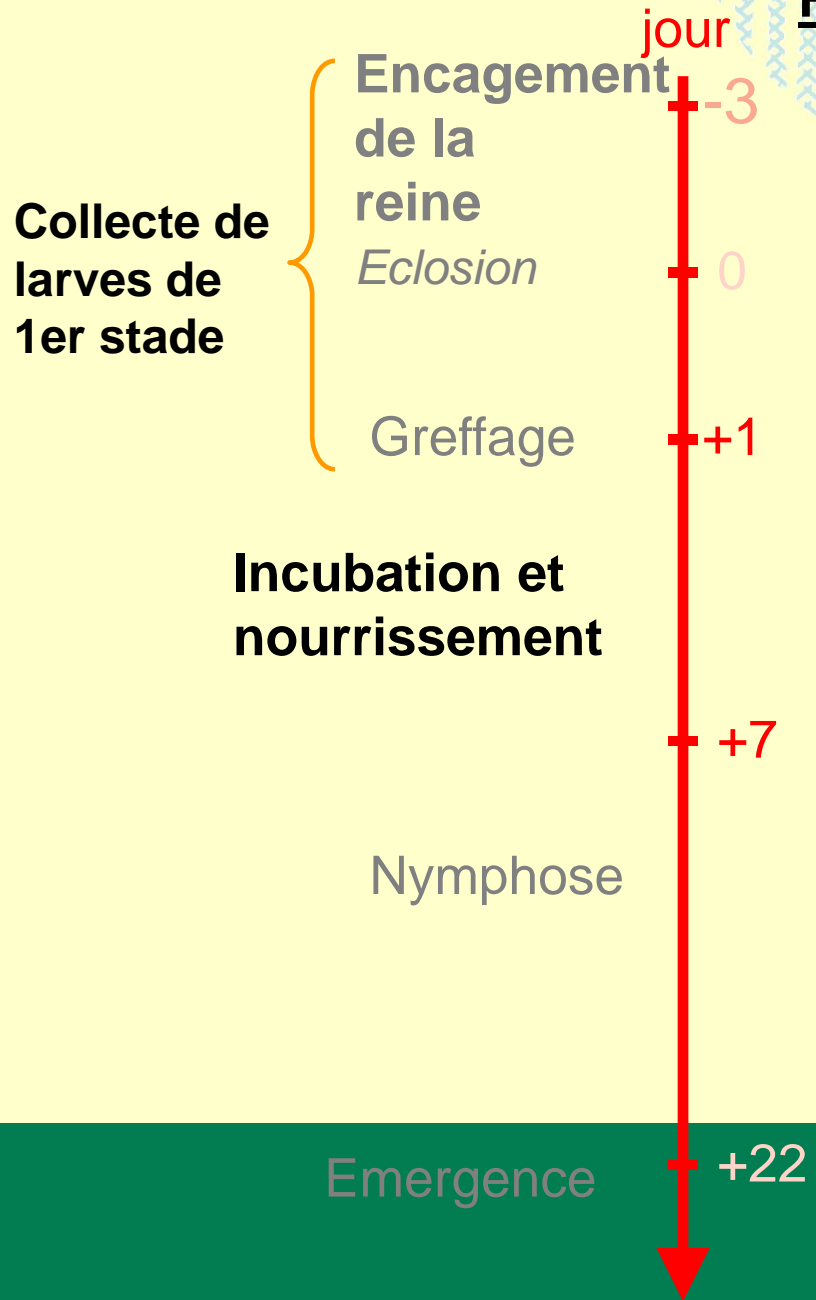
Diapositive 13

PA8

From the first to the seventh day, the larvae are placed into an incubator at 33°C and 98 % of relative humidity. Once a day, each plate is removed from the incubator for feeding with a micro pipet. Here you can see 2 days larvae, and here 6 days larvae.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



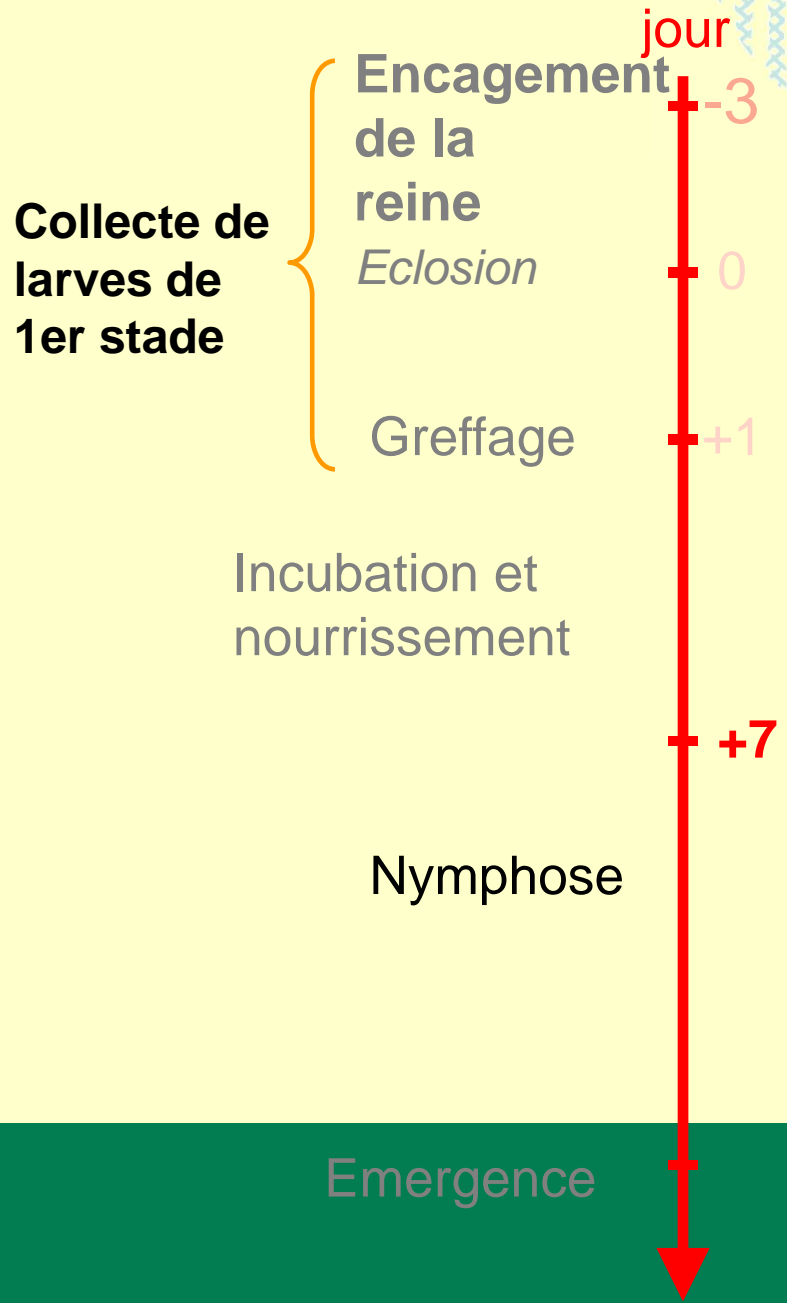
Diapositive 14

PA9

From the first to the seventh day, the larvae are placed into an incubator at 33°C and 98 % of relative humidity. Once a day, each plate is removed from the incubator for feeding with a micro pipet. Here you can see 2 days larvae, and here 6 days larvae.

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



Emergence

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT



Diapositive 15

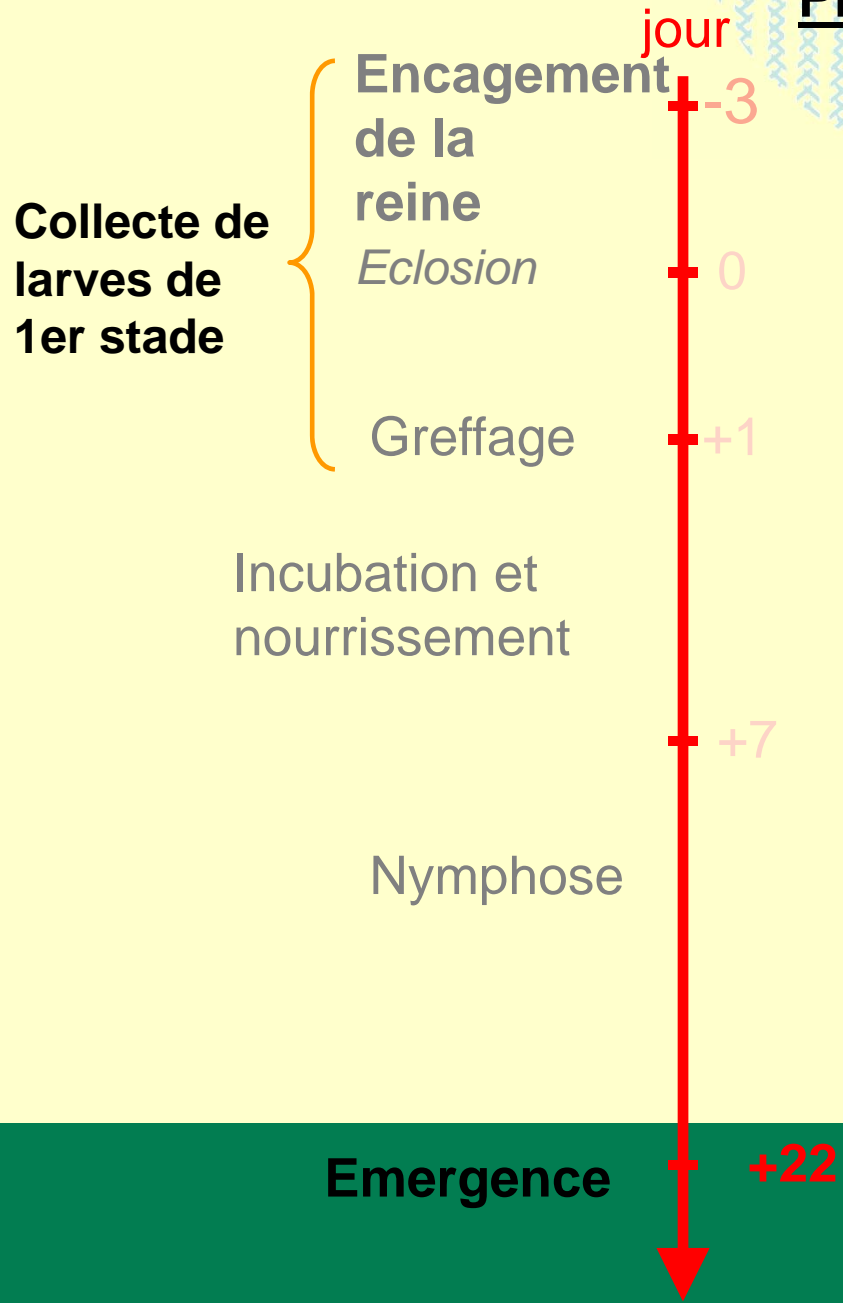
PA11

At the age of seven days (pre pupae stage), the larvae are individually weighted with their cupula to avoid direct handling. During this operation, the plate is placed onto a warm plate regulated at 33°C in order to avoid temperature variation.

Then the plates containing the pre pupae are placed into an other incubator at 33°C and 75 % of relative humidity. Here you can see young pupae and you can notice the homogeneity development and the low mortality rate at this stage

P AUPINEL; 04/10/2005

PRINCIPALES ETAPES DE LA METHODE D'ELEVAGE



Diapositive 16

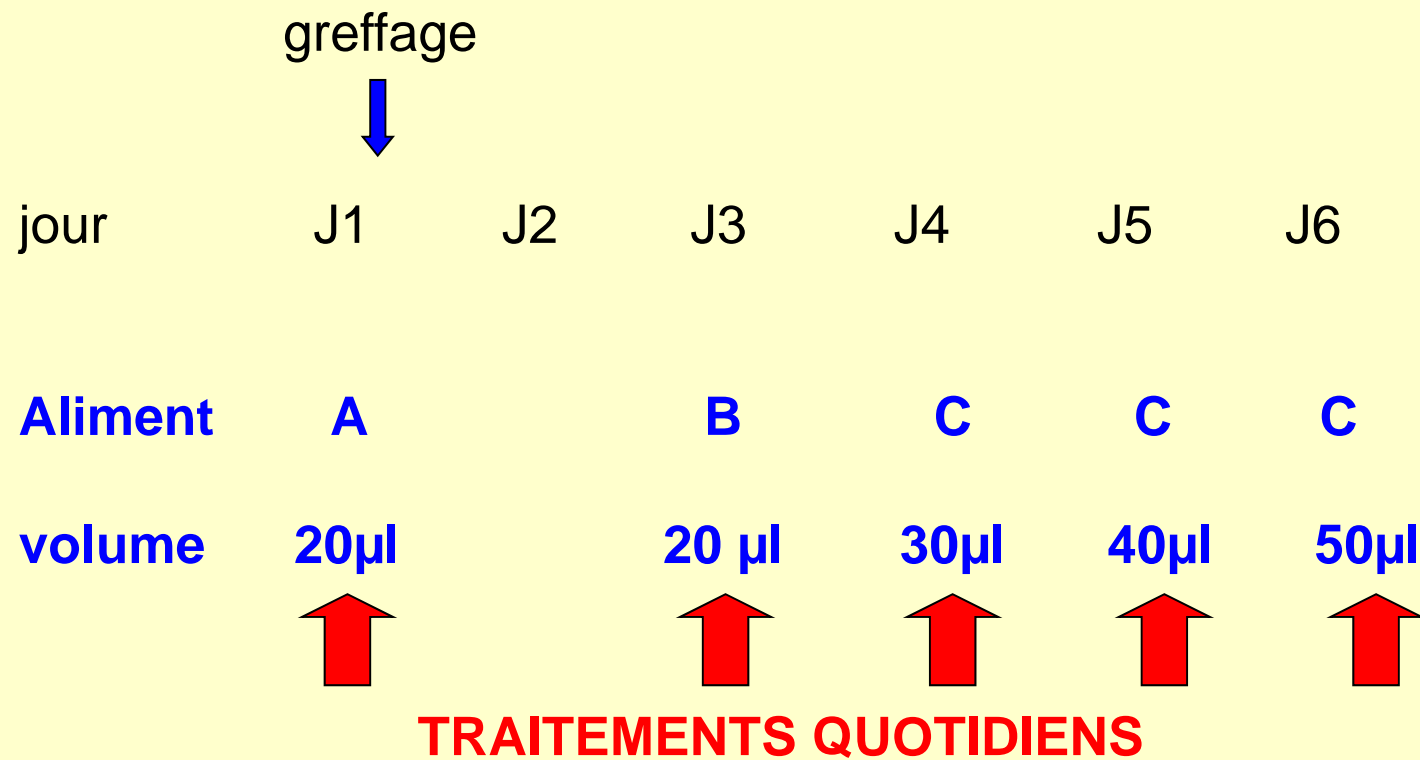
PA12

Before emerging, the plates are placed into plastic boxes equiped with a bird feeder containin sirup and a piece of comb with a bee6boost. At the emergence, young workers gathered around the beeboost.

P AUPINEL; 04/10/2005

Modes d'intoxication :

Chronique



Diapositive 17

PA14

for studying chronic effects, the insecticides was mixed with the three diets at a constant concentration and provided to the larvae every day.

P AUPINEL; 04/10/2005



Méthodes utilisées

Dosage des protéines de la tête

Rapport FEAGA 2010-2011

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA

Méthodes utilisées pour évaluer le développement des GHP:

-Diamètre des acini (Babendrier et al, 2005; Gupta and Chandel, 1994; Hrassnigg and Crailsheim, 1998; Malone et al, 2004)

Dissection de la tête, extraction des glandes, montage entre lame et lamelle dans une solution saline, mesure sous microscope



Diamètre moyen des acini

Inconvénients :

- Temps passé à la dissection
- Mesure subjective (éléments piriformes, déformation due à l'écrasement, nécessité de sélectionner les acini à mesurer)

Dosage des protéines de la tête



Immersion de la tête dans une solution tampon



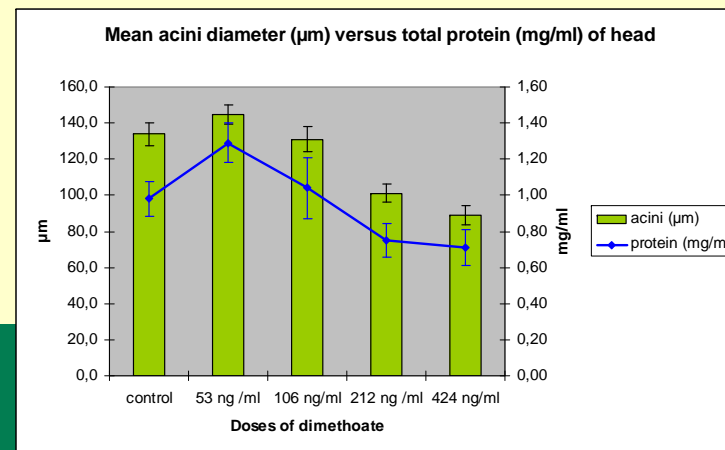
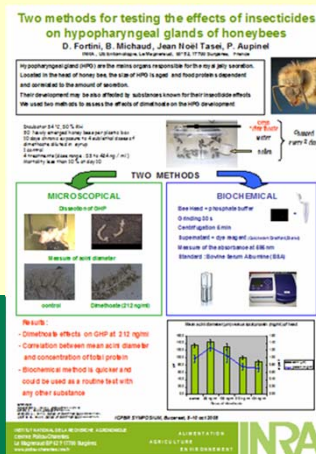
Broyage 1 min en conditions réfrigérées



Centrifugation 10 000 tr/min (5°C) 4 min
Mélange du surnageant avec le réactif Bradford

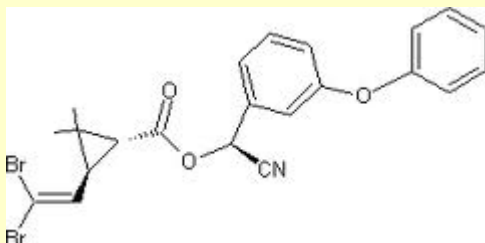


Analyse spectrophotométrique



Molécules testées :

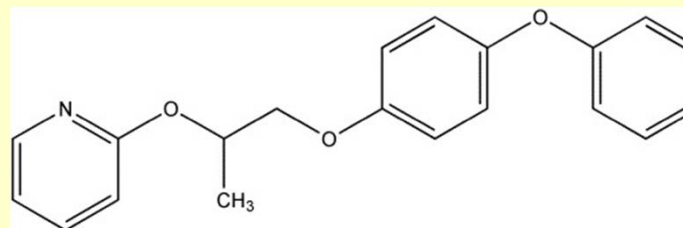
Deltaméthrine



Pyrèthriinoïde

Neurotoxique

Pyriproxifène



Analogue de l'hormone juvénile

Régulateur de croissance (blocage de la mue imaginale)

Protocole expérimental

Lots de 48 larves par traitement

Exposition chronique orale (incorporation des produits dans l'aliment) durant l'élevage larvaire

Gamme de concentrations testées :

Deltaméthrine : 2, 6, 18 ng/larve

Pyriproxyfène : 2, 6, 18, 54, ng/larve

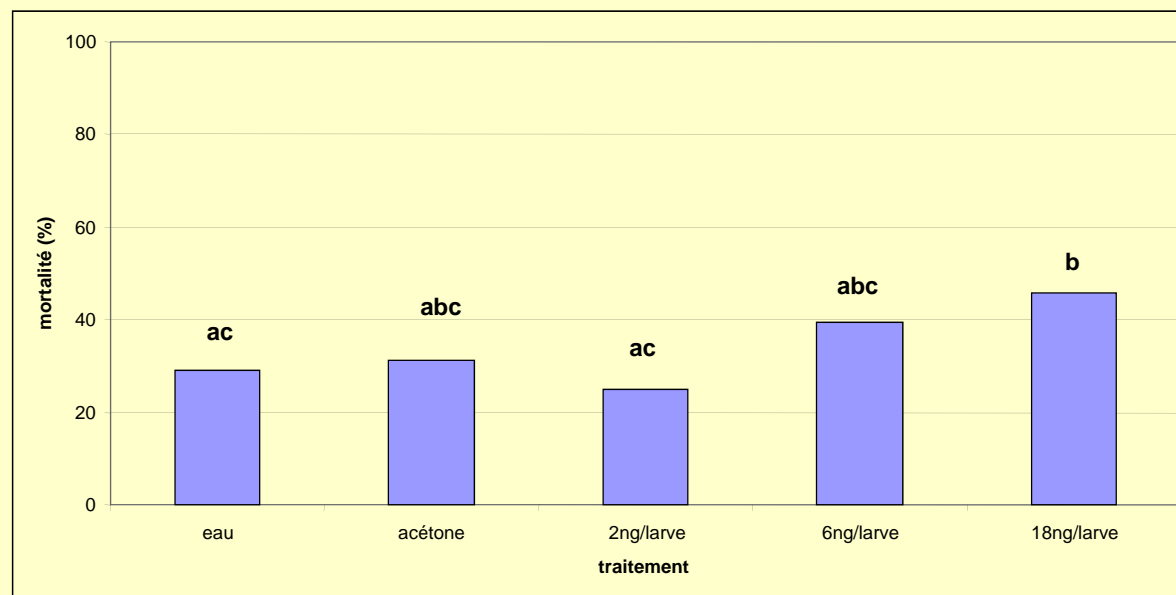
+ 1 témoin eau et 1 témoin acétone

Élevage en étuve jusqu'au stade adulte et maintien en vie pendant 8 j après émergence

Broyage des têtes et dosage des protéines

RESULTATS

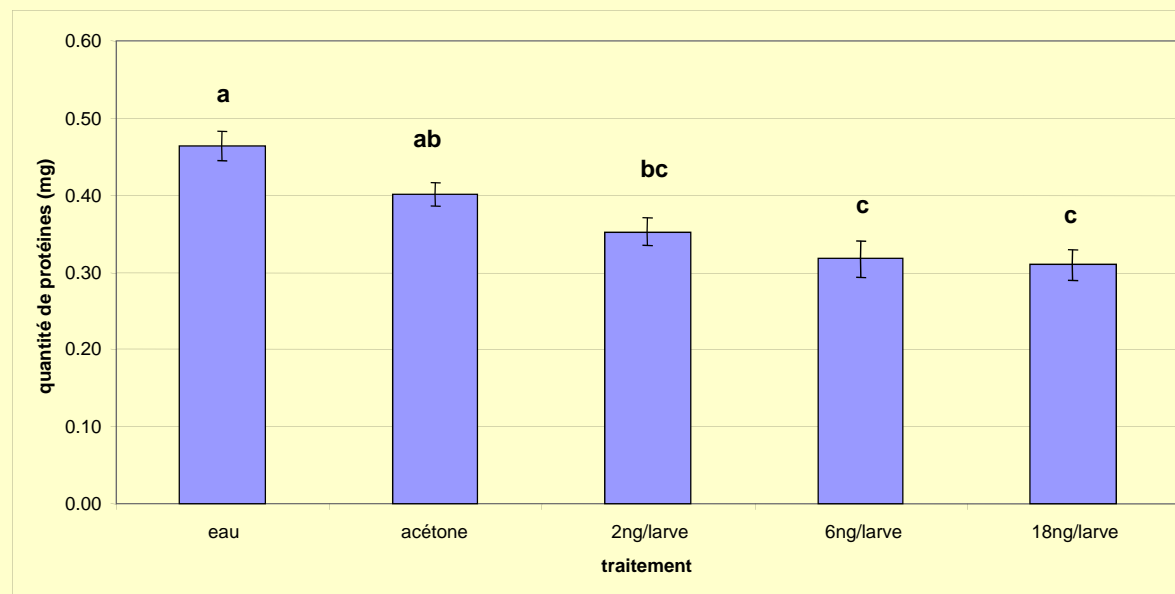
Deltaméthrine



Mortalités cumulées depuis l'émergence jusqu'à l'âge adulte de 8 jours en fonction des concentrations d'exposition à la deltaméthrine durant le stade larvaire. (Khi2)

RESULTATS

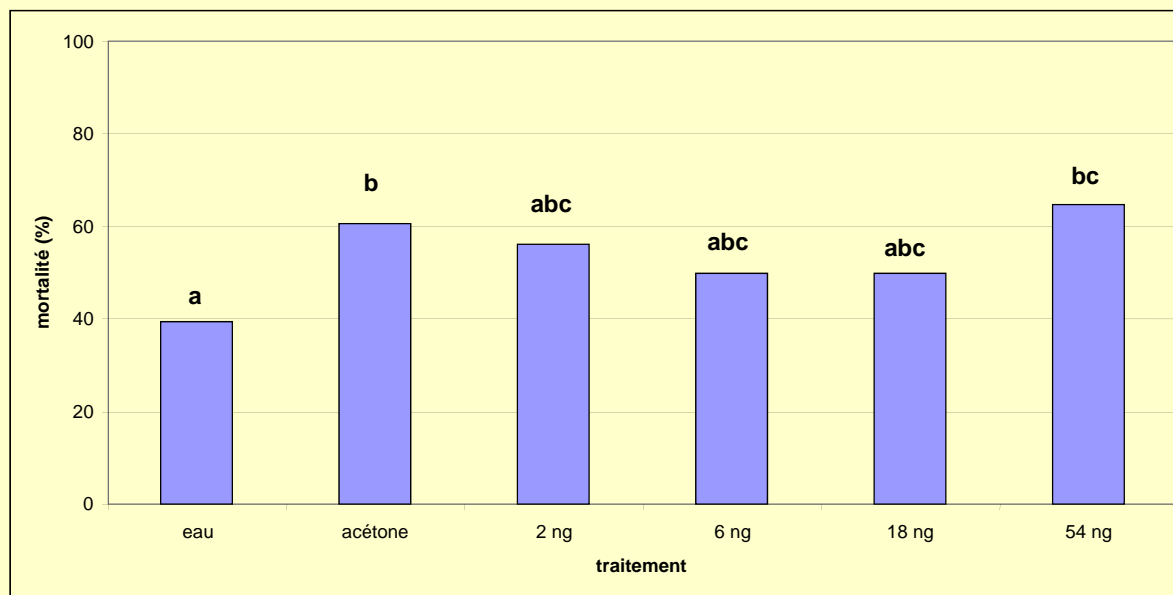
Deltaméthrine



Quantités de protéines contenues dans les têtes à l'âge de 8 jours en fonction des doses d'exposition à la deltaméthrine durant le stade larvaire. (ANOVA)

RESULTATS

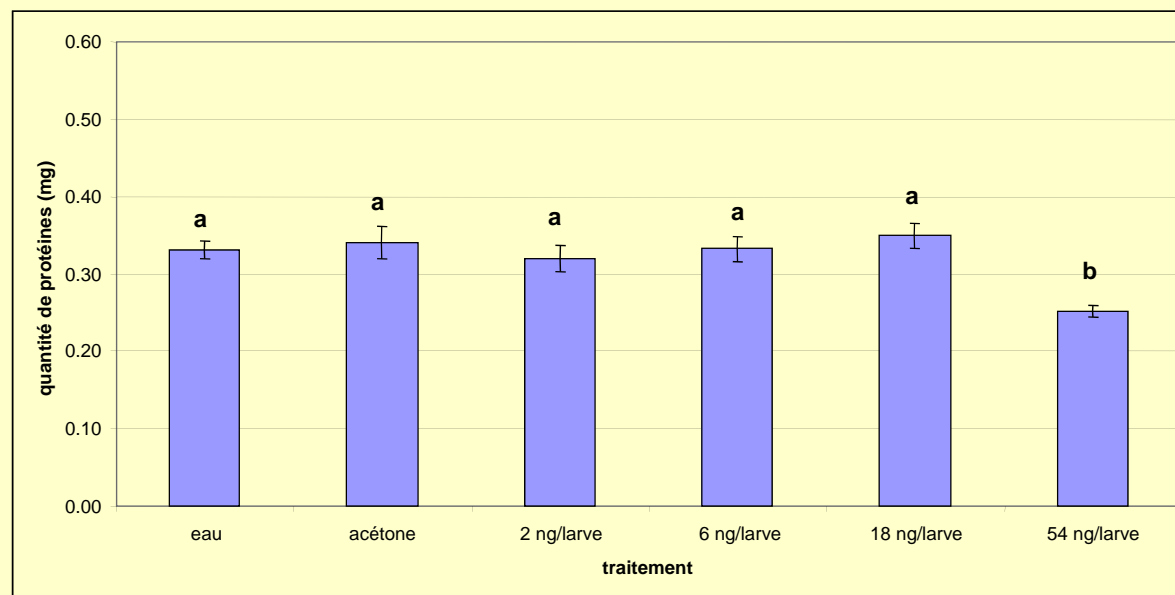
Pyriproxyfène



Mortalités cumulées depuis l'émergence jusqu'à l'âge adulte de 8 jours en fonction des concentrations d'exposition au pyriproxyfène durant le stade larvaire. (Khi2)

RESULTATS

Pyriproxyfène

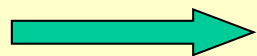


Quantités de protéines contenues dans les têtes à l'âge de 8 jours en fonction des doses d'exposition au pyriproxyfène durant le stade larvaire. (ANOVA)

Quels sont les risques d'exposition réels ?

2 à 5,4 mg de pollen ingérés par la larve durant son développement (Babendrier et al., 2005 ; Rortais et al, 2005)

0,605 mg de deltaméthrine résiduelle par g de pollen de colza traité au Decis (Taséi et al, 1994)



1 ng/larve > Exposition > 3 ng/larve de deltaméthrine

(effet entre 2 et 6 ng)



Conclusion

- Existence d'une relation de cause à effet entre une exposition au stade larvaire et le développement des GHP chez l'adulte
- Nécessité d'évaluer la toxicité des matières actives en intégrant la notion de délai
- Mieux considérer à l'échelle de la colonie les effets dits sublétaux au plan individuel

Ont participé à ce travail :
L. Roucher
C. Toullet



*Cette étude a été en partie financée par le Ministère
de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports
et du Logement (Programme PNRPE).*

ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

INRA