

LES EFFETS DE PESTICIDES SUR L'APPRENTISSAGE OLFACTIF CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE *APIS MELLIFERA* L.

Axel Decourtye, Bernard Roger, Jean-François Odoux, Minh-Hà Pham-Delègue

Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés,
INRA, La Guyonnerie, BP 23, 91440 Bures/Yvette, France
Fax : 01.69.07.50.54 ; e-mail : decourty@jouy.inra.fr

Sophie Cluzeau, Association de Coordination Technique Agricole,
149 rue de Bercy, 75595 Paris Cedex 12, France

Résumé : Le but de ce travail est d'évaluer en laboratoire les effets sublétaux d'un insecticide (deltaméthrine) et d'un fongicide (prochloraze), communément utilisés en phytoprotection du tournesol, sur le comportement de l'abeille, insecte pollinisateur de cette culture. Après 11 jours de traitements par ingestion, nous avons étudié les effets de la deltaméthrine et du prochloraze, utilisés séparément ou sous forme associée, sur les performances d'apprentissage olfactif grâce à la procédure de conditionnement olfactif du réflexe d'extension proboscis. Nous nous sommes intéressés à l'éventuel impact des traitements sur l'acquisition des réponses conditionnées au cours de présentations odeur-nourriture et sur l'extinction de ces réponses au cours de présentations non renforcées de l'odeur apprise. L'ingestion de doses sublétales de deltaméthrine, prochloraze et de l'association deltaméthrine-prochloraze n'a pas d'impact sur les capacités d'acquisition des réponses conditionnées, mais elle semble diminuer la résistance à l'extinction des réponses. Cependant, l'action synergique des deux produits n'a pas été démontrée. Notre étude confirme l'intérêt de la procédure de conditionnement olfactif de type pavlovien dans le but de dépister les effets sublétaux de certains produits agrochimiques chez l'abeille.

Summary : THE EFFECT OF PESTICIDES ON THE OLFACTORY LEARNING IN THE HONEYBEE *APIS MELLIFERA* L. The aim of this work was to evaluate under laboratory conditions the sublethal effects of one insecticide (deltamethrin) and one fungicide (prochloraz), commonly used for sunflower protection, on the behavior of *Apis mellifera* L., the main pollinating insect of this crop. After 11 days of oral administration, we studied the effects of deltamethrin and prochloraz, used alone or as a mixture, on olfactory learning performances using the olfactory conditioning of the proboscis extension on restrained bees. We studied the potential impact of treatment on the acquisition of conditioned responses during odour-food presentations and on the extinction of conditioned responses during repeated unrewarded presentations of the conditioning stimulus. This procedure showed that honey bees surviving the treatments had no reduced acquisition performances, whilst less resistance to extinction of the conditioned responses was found. However, no synergistic action between products was demonstrated. Our results confirm that the olfactory conditioned proboscis extension may be a suitable procedure to measure pesticides sublethal effects in the honeybee.

INTRODUCTION

La législation française exige la présentation de données écotoxicologiques sur l'abeille domestique pour la mise sur le marché des produits phytosanitaires appliqués sur plantes mellifères en cours de floraison. L'évaluation des risques écotoxicologiques repose essentiellement sur des tests de toxicité aiguë du produit. Le rapport entre la dose par hectare, recommandée en utilisation agricole, et la toxicité évaluée en laboratoire permet de présager le risque encouru par les pollinisateurs sur une culture précise (Atkins *et al.*, 1981). Cependant l'étude des effets létaux des produits phytosanitaires ne peut pas prévenir l'ensemble des risques d'intoxication car la toxicité d'un produit ne se limite pas seulement à sa létalité. En effet, les effets comportementaux de certains insecticides sur les abeilles sont connus : des doses sublétales de parathion affectent le recrutement des butineuses en perturbant les paramètres de la danse oscillante (Schricker et Stephen 1970 ; Brandes, 1984); des doses sublétales de perméthrine et de deltaméthrine perturbent les capacités d'orientation des butineuses (Cox et Wilson, 1984 ; Vandame *et al.*, 1995). Malgré ces résultats il n'existe pas actuellement de moyens objectifs permettant de mesurer et de détecter ces effets. Notre étude s'inscrit dans un programme de recherche visant à déterminer si les tests de laboratoire à notre disposition permettent de mettre en évidence un impact des produits phytosanitaires sur le comportement des abeilles. Nous avons utilisé le conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis (langue de l'abeille) afin d'évaluer les effets de faibles doses de deltaméthrine et de prochloraze sur les capacités d'apprentissage olfactif de l'abeille. Ces deux produits agrochimiques ont été utilisés séparément et sous forme associée. La deltaméthrine et le prochloraze ont été choisis car leur utilisation est fréquente en pratique agricole, notamment pour la protection de plantes mellifères telles que le tournesol et le colza. De plus, l'utilisation simultanée de ces deux produits au cours de la floraison aurait causé de nombreux cas d'intoxications de ruches sur le terrain. La synergie de la deltaméthrine et du prochloraze a été démontrée sur le plan de la toxicité aiguë sous tunnel (ACTA, 1988) et en laboratoire (Colin et Belzunces, 1992 ; Chalvet-Monfrey *et al.*, 1996). Notre approche comportementale repose sur l'étude du comportement de butinage à l'échelle individuelle et a déjà permis de mettre en évidence une diminution des performances d'apprentissage chez les ouvrières exposées à des insecticides (Taylor *et al.*, 1987 ; Mamood et Waller, 1990 ; Stone *et al.*, 1997 ; Abramson *et al.*, 1999).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Produits agrochimiques

La deltaméthrine est un insecticide d'origine britannique (NRDC), développé en France par AgrEvo sous l'appellation commerciale Décis® (25 g/l de deltaméthrine). Il agit par ingestion et par contact sur un grand nombre d'insectes et à des doses très faibles. La deltaméthrine est utilisée pour la protection des grandes cultures, des cultures forestières, ornementales, en viticulture et sur arbres fruitiers. Elle a de multiples cibles d'action mais la principale serait les canaux sodiques voltage-dépendants (Soderlund et Bloomquist, 1989) perturbant ainsi la transmission du message nerveux chez l'insecte traité. La deltaméthrine est considérée comme très toxique pour l'abeille en laboratoire (Atkins *et al.*, 1981) alors que les expérimentations en plein champ n'ont jamais pu mettre en évidence cette toxicité (Bos, 1981). Le prochloraze est un fongicide appartenant à la famille des imidazoles qui est doté d'une action translaminaire

importante (il pénètre dans la plante et diffuse de cellule à cellule dans les tissus de la feuille). Il est surtout utilisé contre les mycoses des céréales (blé, orge) et du colza. Ce produit entraînerait à la fois une induction *in vivo* et une inhibition *in vivo* et *in vitro* des activités enzymatiques du cytochrome P-450 (Laignelet *et al.*, 1989) dont les monooxygénases interviennent dans la métabolisation des xénobiotiques.

2. Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées avec des abeilles de race italienne, *Apis mellifera ligustica*. Les prélèvements des abeilles ouvrières, à partir de cadres de couvain provenant de différentes ruches, ont été réalisés du 15 au 30 septembre 1998. Elles ont été maintenues en étuve (33°C; 55 % HR) par lot de 50 individus dans des cagettes d'élevage, approvisionnées *ad libitum* en sucre et en eau pendant les trois premiers jours et en pollen pendant les huit premiers jours. Au bout de trois jours, le sucre a été remplacé par une solution sucrée (saccharose à 50 %) contaminée ou non contaminée contenue dans deux abreuvoirs de 2 ml (précision de 0,5 ml). Chaque jour, la mortalité a été comptabilisée et la consommation en sirop a été relevée tous les 2-3 jours. Les abeilles testées ultérieurement (30 à 40 individus âgées de 15 et 16 jours) ont été prélevées parmi celles ayant survécu à l'exposition aux produits.

3. Modalités de traitement

Pour les deux produits (qualité technique ; Agrevo), trois doses ont été administrées par ingestion pendant 11 jours grâce à la contamination de la solution alimentaire de saccharose à 50 % (masse). Les abeilles témoins ont été nourries avec une solution de saccharose 50 %. La concentration en acétone des sirops alimentaires contaminés ou non contaminés est de 10 ml par litre. Les doses administrées sont inférieures aux DL 50 d'ingestion des produits (Tabl. 1). Afin de préparer les solutions sucrées contaminées, nous considérons qu'une abeille consomme 30 µl de solution par jour. Les modalités de traitements et les tests comportementaux ont été répétés 6 fois sur des lots d'abeilles indépendants.

Produits	Doses de référence	Doses expérimentales	
	DL 50 orale	Doses	Concentrations
Deltaméthrine	79 ng/abeille	10 ng/abeille	144 µg/l
		2 ng/abeille	28,8 µg/l
		1 ng/abeille	14,4 µg/l
Prochloraze	60 µg/abeille	10 µg/abeille	144 mg/l
		2 µg/abeille	28,8 mg/l
		1 µg/abeille	14,4 mg/l
Deltaméthrine + Prochloraze	-	10 ng D + 10 µg P	144 µg/l D + 144 mg/l P
		2 ng D + 2 µg P	28,8 µg/l D + 28,8 mg/l P
		1 ng D + 1 µg P	14,4 µg/l D + 14,4 mg/l P

Tabl. 1 : Les doses administrées.

4. Procédure de conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis

Le réflexe d'extension du proboscis est déclenché par l'application d'une solution sucrée de saccharose 30 % (masse) sur les antennes. Lorsque cette stimulation (Stimulus Inconditionnel =

SI) est associée à la présence d'un stimulus olfactif (Stimulus Conditionnel = SC) et que l'on administre une récompense alimentaire comme récompense, on obtient ultérieurement une extension du proboscis par présentation du stimulus olfactif seul (Réponse Conditionnée = RC) (Bitterman *et al.*, 1983). Le nombre de RC d'un insecte est le paramètre mesuré révélant ses capacités d'apprentissage olfactif. Les abeilles subissent un jeûne préalable 4 heures. L'ensemble des stimulations, SC/SI-R, correspond à un essai de conditionnement. Chaque abeille subit 3 essais de conditionnement espacés de 15 à 20 minutes. Cette phase permet d'évaluer un éventuel effet du traitement sur l'acquisition des réponses. Lors de la phase de test, une abeille est soumise à 5 tests espacés de 15 à 20 minutes. Un test correspond à l'application de l'odeur seule (SC) pendant 6 secondes. Cette phase permet d'évaluer un éventuel effet du traitement sur l'extinction des réponses. Nous avons utilisé comme odeur le linalol pur (95 à 97 % de pureté ; Sigma), composé floral qui induit un conditionnement efficace dans cette procédure expérimentale (Sandoz *et al.*, 1995).

5. Traitement des données

La comparaison entre la mortalité cumulée chez les lots traités avec un produit et chez le lot témoin a été réalisée par un test de Khi-deux à 3 ddl. Le nombre de RC observées à la fin de la phase d'acquisition et à la fin de la phase d'extinction a été analysé par un test de Khi-deux à 3 ddl. Dans le cas où une hétérogénéité est apparue, les différentes modalités de traitement pour un produit ont été comparées deux à deux par un test de Khi-deux à 1 ddl. Le seuil de signification de 5 % a été divisé par n, n étant le nombre de comparaisons dans lesquelles chaque donnée a été utilisée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après 11 jours d'administration par ingestion, les produits provoquent une mortalité cumulée inférieure ou équivalente à celle observée chez les témoins (Fig. 1).

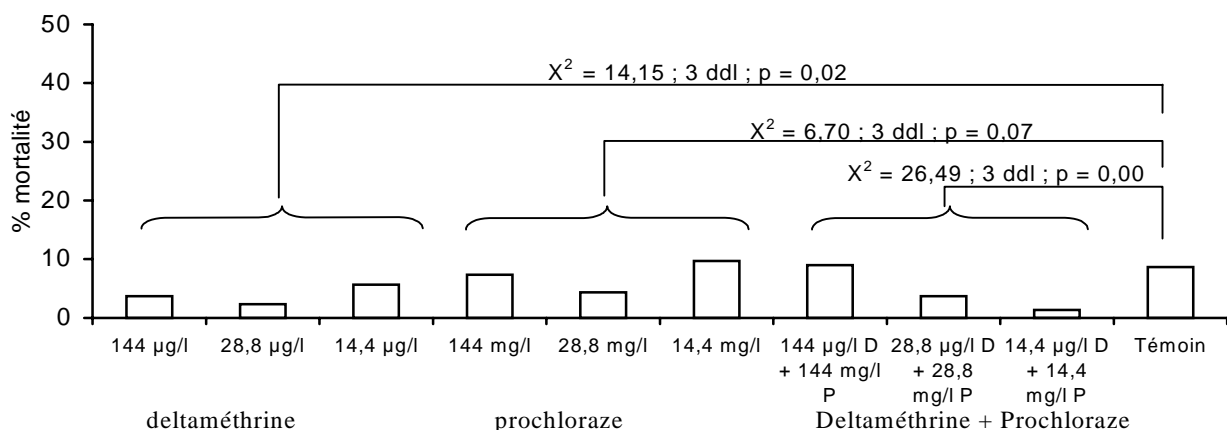


Fig. 1 : Mortalité cumulée après 11 jours d'administration orale des produits phytosanitaires. Les trois concentrations de chaque produit et le lot témoin ont été comparés par un test de Khi-deux à 3 ddl, $p < 0,016$.

Lors de la procédure de conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis, les traitements n'affectent pas les performances d'apprentissage à la fin de la phase d'acquisition, par

contre des différences significatives sont observées sur les performances à la fin de la phase d'extinction (Fig. 2).

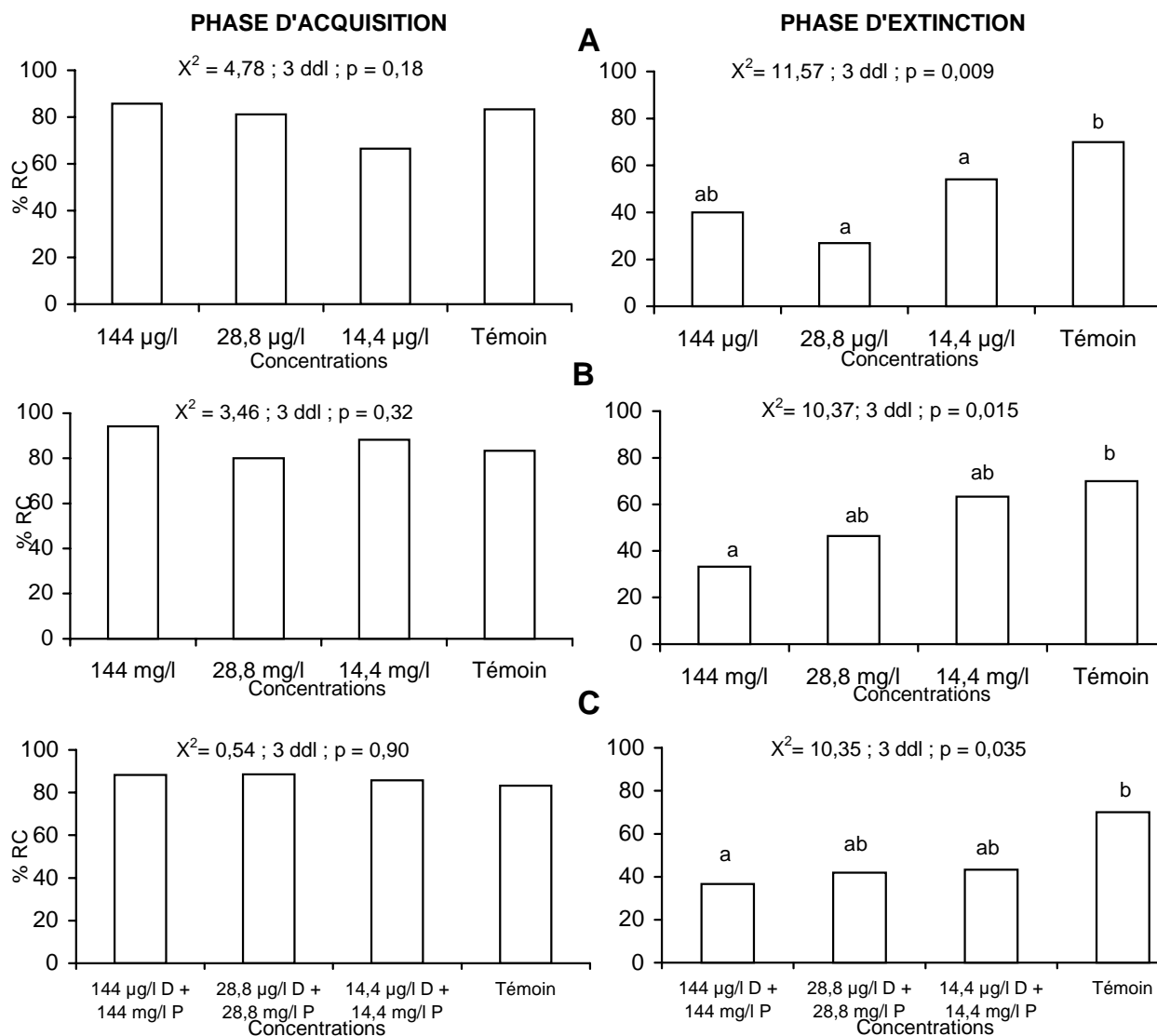


Fig. 2 : Performances d'apprentissage à la fin de la phase d'acquisition et d'extinction.

A : Deltaméthrine ; B : Prochloraze ; C : Deltaméthrine et Prochloraze

Le nombre de RC pour les différents traitements ont été comparés par un test de Khi-deux à 3 ddl, $p < 0,05$. Dans le cas d'une hétérogénéité, les traitements ont été comparés deux à deux par un test de Khi-deux à 1 ddl (les traitements sans lettre commune sont significativement différents à $p < 0,01$).

Seule l'ingestion de la deltaméthrine à la concentration intermédiaire (28,8 µg/l) réduit significativement le pourcentage de RC à la fin de la phase d'extinction (40 %). Nous n'avons pas mis en évidence d'effet concentration pour ce produit. L'administration du prochloraze et du mélange deltaméthrine-prochloraze aux plus fortes concentrations affecte significativement les performances à la fin de la phase d'extinction. Malgré l'absence d'impact sur les capacités d'acquisition de l'apprentissage, l'ensemble des traitements diminue les performances d'apprentissage des abeilles au cours de la phase d'extinction de la procédure de conditionnement. En d'autres termes, les abeilles traitées apprennent correctement la valeur

prédictive de l'odeur mais mémorisent moins longtemps celle-ci. Lors de précédents travaux nous avons constaté une diminution des performances d'apprentissage après intoxication des abeilles pendant 11 jours avec des doses sublétales d'imidaclopride et d'endosulfan (Decourtye, 1998). Les effets amnésiques de certains pyréthriinoïdes ont également été mis en évidence grâce à la procédure de conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis (Taylor *et al.*, 1987 ; Mamood et Waller, 1990 ; Abramson *et al.*, 1999). Ainsi nos résultats confirment de précédents travaux démontrant l'intérêt de la procédure de conditionnement olfactif de type pavlovien dans le but de dépister les effets sublétaux de produits phytosanitaires chez l'abeille. Vandame *et al.* (1996) ont mis en évidence une altération de l'orientation des butineuses au cours du vol de retour à la ruche après pulvérisation de deltaméthrine à la dose sublétale de 2,5 ng/abeille. Nos résultats expérimentaux suggèrent que cette dose de deltaméthrine ne perturbe pas les processus de stockage de l'information car les abeilles traitées apprennent efficacement l'association odeur-nourriture au cours de la phase d'acquisition. Cependant ce pyréthriinoïde semble altérer les mécanismes intervenant dans le rappel de l'information au cours de la phase d'extinction. Les effets délétères de la deltaméthrine sur les performances d'apprentissage sont toutefois à confirmer puisque cette étude n'a pas permis de mettre en évidence d'effet dose-dépendant pour ce produit. De plus, nous n'avons pas constaté de synergie entre la deltaméthrine et le prochloraz ni sur la mortalité, ni sur l'apprentissage. Dans les autres travaux démontrant la synergie de la deltaméthrine et du prochloraz (Colin et Belzunces, 1992 ; Chalvet-Monfray *et al.*, 1996), les produits sont appliqués par pulvérisation et non par contamination d'une solution alimentaire comme dans notre expérimentation. Nous pouvons supposer que le mode d'administration peut influencer l'interaction entre les deux molécules. Nos résultats suggèrent que la diminution de l'activité de butinage après pulvérisation de pyréthriinoïdes (Bocquet *et al.*, 1980 ; Delabie *et al.*, 1985), ou après pulvérisation de l'association deltaméthrine-prochloraz à des doses sublétales (Miniggio *et al.*, 1990), peut être due à l'incidence des produits sur le processus d'apprentissage individuel au cours du comportement de butinage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramson C I, Aquino I S, Ramalho F S, Price J M (1999) The Effect of Insecticides on Learning in the Africanized Honey Bee (*Apis mellifera* L.). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 37:529-535.
- Association de Coordination Technique Agricole (1988) Expérimentation 1987-1988, Service Lutte Anti-parasitaire. ACTA, Paris, 24-28.
- Atkins E L, Kellum D, Atkins K W (1981) Reducing Pesticides Hazards to Honey Bees : Mortality Prediction Techniques and Integrated Management Strategies. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Leaflet, 2883.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honey bees (*Apis mellifera*). J. Comp. Psychol., 97:107-119.
- Bocquet J, L'Hotellier M, Fevre F, Baumeister R (1980) A five-year study on the effect of deltamethrin on bees under natural conditions. Res. Div., Roussel - Uclaff, 1-11.
- Bos C (1981) Mode d'action des pyréthriinoïdes de synthèse sur l'abeille. Approches au laboratoire et en plein champ. DEA de Nutrition : Biochimie Industrielle Alimentaire, Université de Paris VII, ENSIA., 39 p.
- Brandes C von (1984) Tanztempo, Zuckerbrauch, Lauf-, Fluggeschwindigkeit und Flügelschlagfrequenz von *Apis mellifera carnica* nach subletaler Parathionvergiftung. Zool. Jb. Physiol., 345-359.
- Chalvet-Monfray K, Belzunces LP, Colin ME, Fléché C, Sabatier P (1996) Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: modeling approach. Environ. Toxicol. Chem., 15:525-534.
- Colin ME, Belzunces LP (1992) Evidence of Synergy between Prochloraz and Deltamethrin in *Apis mellifera* L. : A convenient Biological Approach. Pestic. Sci., 36:115-119.
- Cox RL et Wilson WT (1984) Effects of Permethrin on the Behavior of Individually Tagged Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae). Environ. Entomol., 13:375-378.

- Decourtye A (1998) Etude des effets sublétaux de l'imidaclopride et de l'endosulfan sur l'apprentissage olfactif chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L. DEA de Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration, Université de Montpellier II., 12 p.
- Delabie J, Bos C, Fonta C, Masson C (1985) Toxic and Repellent Effects of Cypermethrin on the Honeybee: Laboratory, Glasshouse and Field Experiments . Pestic. Sci., 16:409-415.
- Laignelet L, Narbonne JF, Lhuguenot JC, Rivière JL (1989) Induction and inhibition of rat liver cytochrome(s) P-450 by imidazole fungicide (prochloraz). Toxicology, 59:271-284.
- Mamood AN et Waller GD (1990) Recovery of learning responses by honeybees following a sublethal exposure to permethrin. Physiol. Entomol. 15:55-60.
- Miniggio C, Borneck R, Arnold G (1990) Etudes des effets à long terme des pesticides chez l'abeille *Apis mellifera*. Ministère de l'environnement SRETIE, 17 p.
- Sandoz JC, Roger B, Pham-Delègue MH (1995) Olfactory learning and memory in the honeybee : comparaison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. C. R. Acad. Sci., Sci. Vie., 318:749-755.
- Schricker B et Stephen WP (1970) The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. I. Oral administration and the communication dance. J. Apic. Res., 9(3):141-153.
- Soderlund DM et Bloomquist JR (1989) Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. Annu. Rev. Entomol., 34:77-96.
- Stone JC, Abramson CI, Price JM (1997) Task-dependant Effects of Dicofol (Kelthane) on Learning in the Honey Bee (*Apis mellifera* L.). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 58:177-183.
- Taylor KS, Waller GD, Crowder LA (1987) Impairment of the classical conditioned response of the honeybee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic pyrethroid insecticides. Apidologie, 18(3):243-252.
- Vandame R, Meled M, Colin ME, Belzunces LP (1995) Alteration of the homing-flight in the honeybee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. Environ. Toxicol. Chem., 14:855-860.