

Effets de l'atrazine, du métolachlore et du glyphosate sur la défense antioxydante de l'abeille



Monique Boily, Ph.D. en Sciences de l'environnement, Professeure associée, UQAM, membre du Centre TOXEN (Toxicologie de l'environnement)

Collaborateurs :

Stephanie Hedrei Helmer, Philippe Aras et Catherine Jumarie. Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal

Anahi Kerbaol. Département des Sciences de l'Environnement, Université du Québec à Montréal

Problématique. L'état de santé de l'abeille domestique n'a jamais été aussi préoccupant qu'aujourd'hui. Au Québec, comme ailleurs dans le monde, on observe un affaiblissement généralisé des colonies d'abeilles, accompagné d'un taux de mortalité alarmant. Ceci a de graves conséquences économiques non seulement pour les apiculteurs qui exploitent les produits de la ruche (miel, pollen, etc.) et les producteurs agricoles dont les rendements dépendent de l'abeille domestique (arbres fruitiers, petits fruits, cucurbitacées, solanacées, etc.), mais aussi pour les besoins alimentaires de toute la société. La contamination de l'environnement peut contribuer à l'adversité qui frappe les abeilles car elles sont exposées à une panoplie de produits phytosanitaires, principalement en milieu agricole. Or nous disposons de très peu d'outils diagnostiques, hormis la mortalité, pour juger de l'impact de ces expositions sur les abeilles. Cette lacune peut être comblée en développant des biomarqueurs (effets physiologiques ou mesures biochimiques quantifiables en réponse à des contaminants) appropriés à l'abeille.

Depuis plusieurs années les cultures de maïs et de soya dominent le paysage agricole du Québec. Dans ce type de culture, des herbicides comme atrazine, métolachlore et glyphosate sont régulièrement employés. Les types d'engrais utilisés en champs varient. Ils peuvent être naturels (fumiers et lisiers), chimiques (sels de nitrate et phosphore) ou provenir de matières résiduelles fertilisantes (MRF) issues d'usines d'épuration des municipalités. Suite aux applications répétées d'engrais, les métaux s'accumulent dans les sols agricoles et sont absorbés par les plantes que les abeilles butinent. La toxicité des métaux peut s'exercer par le biais d'une compétition avec les éléments essentiels à l'abeille et naturellement présents, tel le calcium, qui joue un rôle dans l'olfaction et la mémoire des abeilles. De plus, certains métaux et herbicides ont pour effet d'augmenter le stress oxydatif, résultant d'excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui ne sont pas neutralisées par des antioxydants endogènes. S'ensuivent des dommages

aux protéines, à l'ADN, à l'ARN et aux membranes cellulaires. Chez les vertébrés, les antioxydants non enzymatiques endogènes sont des caroténoïdes et des vitamines (E et A). Certains caroténoïdes sont des précurseurs de la vitamine A, vitamine essentielle à la différenciation cellulaire, la croissance et la vision. Hormis quelques publications, nous connaissons très peu le système antioxydant des abeilles. Le but de cette étude est donc de vérifier si des contaminants agricoles peuvent induire un stress oxydatif chez l'abeille et, parallèlement, d'identifier les antioxydants dont elle dispose pour le neutraliser.

Méthodologie. Des abeilles provenant d'une même ruche ont été exposées, en cagettes, pendant 10 jours, à de faibles doses d'herbicides couramment utilisés dans les cultures de maïs et de soya (atrazine, métolachlore et glyphosate) ainsi qu'aux métaux détectés dans le pollen de maïs (plomb, cadmium et aluminium). En 2013, des ruches d'abeilles ont été installées dans des champs de maïs reflétant quatre conditions de culture: biologique, chimique, minéral ou utilisant des MRF. Pour toutes les conditions d'exposition, les abeilles ont été analysées pour mesurer:

- Peroxydation des lipides (mesure générale du stress oxydatif); test TBARS
- Caroténoïdes, rétinoïdes (vitamine A) et tocophérols (vitamine E); CLHP
- Protéines (Bradford)
- Métaallothionéines (protéines induites en présence de métaux); CLHP
- Analyses de pollen et d'abeilles pour les teneurs en métaux

Résultats pour les expositions en cage

Les abeilles exposées à l'atrazine et au glyphosate possédaient des concentrations de β -carotène inférieures au groupe contrôle alors que les abeilles traitées au métolachlore avaient moins de lutéine. De plus faibles concentrations de rétinol ont été observées chez les abeilles exposées à l'atrazine et au glyphosate alors que le métolachlore semblait produire l'effet inverse. Les niveaux de tocophérol, d' α -cryptoxanthine, de β -cryptoxanthine et de β -carotène étaient plus élevés chez les abeilles exposées à l'atrazine tandis que la concentration en zéaxanthine était plus élevée suite au traitement au glyphosate reflétant ainsi la disponibilité des ressources florales. Seul le métolachlore a significativement augmenté les mesures de TBARS et seul le glyphosate a réduit le contenu en protéines. Une diminution significative du poids des abeilles a été observée suite à la plus forte concentration d'atrazine utilisée pour l'exposition, 5.0 ng/abeille.

Les résultats obtenus pour le rétinol pourraient être dus à des variations de concentration en β -carotène, précurseur des rétinoïdes, ou à des modifications d'activités enzymatiques spécifiques au métabolisme des rétinoïdes. L'altération du système des rétinoïdes pourrait avoir des répercussions sur la croissance, la reproduction et la vision de l'abeille. Les recherches se poursuivent afin de préciser les mécanismes d'action à l'origine des résultats obtenus et évaluer si les rétinoïdes pourraient s'avérer de bons biomarqueurs pour les abeilles et éventuellement d'autres pollinisateurs.

Effets des contaminants d'origine agricole sur l'abeille domestique (*Apis mellifera*)



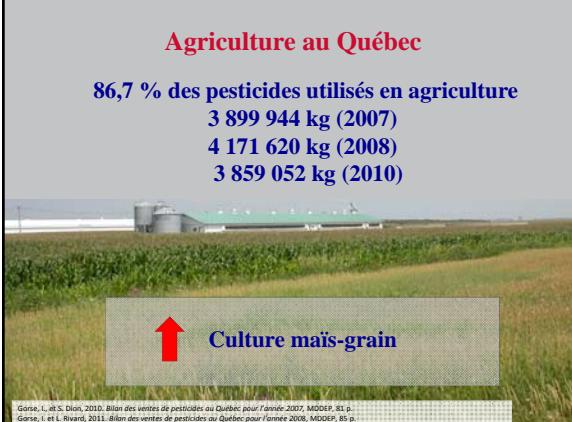
Monique Boily, Stéphanie Hédreli-Helmer, Philippe Aras, Catherine Jumarie
UQAM – Département des Sciences biologiques et Centre Toxen

Journée champêtre en apiculture – CRSAD, Deschambault, 12 juillet 2014

Agriculture au Québec

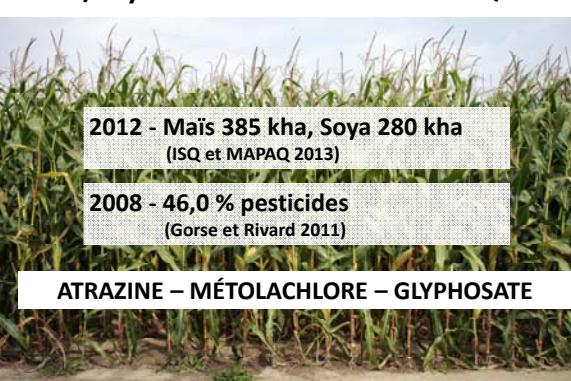
86,7 % des pesticides utilisés en agriculture

- 3 899 944 kg (2007)
- 4 171 620 kg (2008)
- 3 859 052 kg (2010)



Gorse, I., et S. Dion, 2010. Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2007. MDSP, 83 p.
Gorse, I. et L. Rivard, 2011. Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2008. MDSP, 85 p.
Gorse, I. et C. Balig, 2013. Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2010. MDSEPP, 85 p.

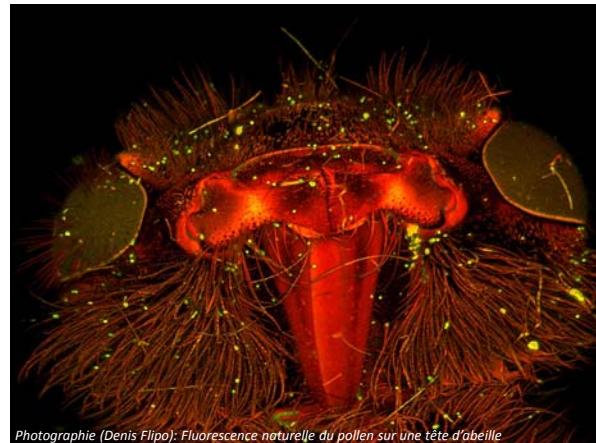
Maïs/Soya = cultures dominantes au Québec



2012 - Maïs 385 kha, Soya 280 kha
(ISQ et MAPAQ 2013)

2008 - 46,0 % pesticides
(Gorse et Rivard 2011)

ATRAZINE – MÉTOLACHLORE – GLYPHOSATE



Effets connus:

- ↑ Stress oxydatif (Atrazine, Métolachlore et Glyphosate)
- ↑ Acide rétinoïque (Glyphosate)

«Développer des biomarqueurs pour évaluer l'état de santé de l'abeille»

La formation de radicaux libres et le stress oxydatif

Produits du métabolisme:

- Radical hydroxyl OH⁻
- Péroxynitrite ONOO⁻
- Oxygène réactif ${}^1\text{O}_2$
- Superoxide $\text{O}_2^{\cdot -}$

La formation de radicaux libres et le stress oxydatif

Enzymes de régulation:

- Superoxide dismutase
- Peroxidase
- Catalase

Antioxydants:

- Carotènes
- Xanthophylles
- Vitamine E (α -tocopherol)
- Rétinoïdes (vitamine A)

La formation de radicaux libres et le stress oxydatif

Radical hydroxyl OH⁻

Péroxynitrite ONOO⁻

Oxygène réactif $^1\text{O}_2$

Superoxide $\text{O}_2^{\cdot -}$

Oxydation des protéines

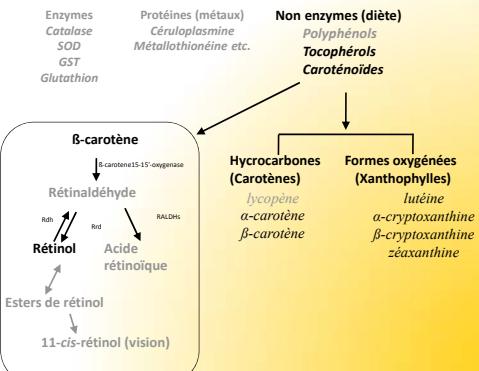
Réactions biochimiques

Système immunitaire

Messagers cellulaires

Peroxydation des lipides
TBARS

Système antioxydant (vertébrés)



MÉTHODOLOGIE

Exposition de ruches (maïs:
biologique, conventionnel,
engrais chimiques, MRF)

Analyses de pollen

Mesures de biomarqueurs

Exposition en cages
(herbicides)

Mesures de biomarqueurs

Exposition en laboratoire 1/3



Atrazine (Aatrex®)
(1,25; 2,5; 5,0 ng/abeille)
Métolachlore (Dual®)
(5,0; 10,0; 20,0 ng/abeille)
Glyphosate (Credit Extreme®)
(1,25; 2,5; 5,0 ng/abeille)

- Valeurs publiées
 - Analyses de pollen de maïs
- Moins 1% DL₅₀**



Exposition en laboratoire 2/3



Abeilles = même ruche
Température (25 ± 1 °C)
Humidité relative (55 ± 5)



30 abeilles/cagette
4 répliquats/dose
Groupes témoins: sirop seul

Exposition en laboratoire 3/3



**2 abreuvoirs (1.5 ml)/cagette
Mortalité**



Après 10 jours:
Euthanasie (glace sèche)
Entreposage -80°C

Méthodologie 1/5

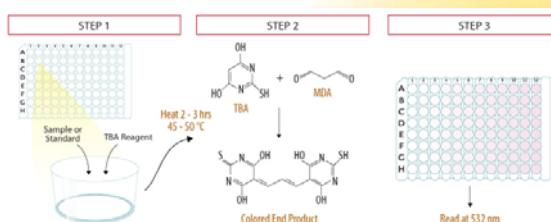
- 6 abeilles + 4 vol H₂O_{nano}
 - 200 µl (TBARS)
 - (0.5% a.a.) + 2ml MeOH
 - Extrait 2X hexane:acétone (50:50) (0.1% BHT)
 - Surnageant évaporé à sec
 - Solubilisation 200 µl MeOH
 - Injection CLHP

Caroténoïdes, vitamines A et E



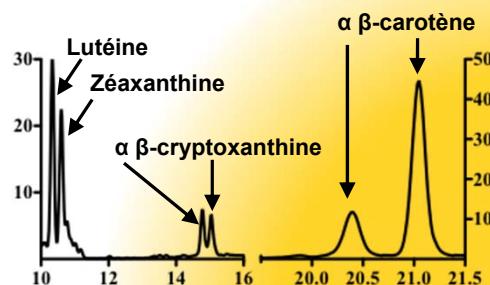
Méthodologie 2/5

Peroxydation des lipides - TBARS

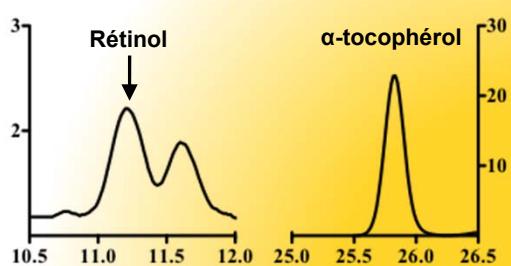


Méthodologie 3/5

Détection des caroténoïdes



Méthodologie 4/5



Méthodologie 5/5

Traitement statistique

**Consommation sirop; ANOVA à 2 critères:
temps, dose et temps x dose
Survie: X²**

Biomarqueurs: GLM/ test Dunnett, KW ou JT

SPSS 18.0

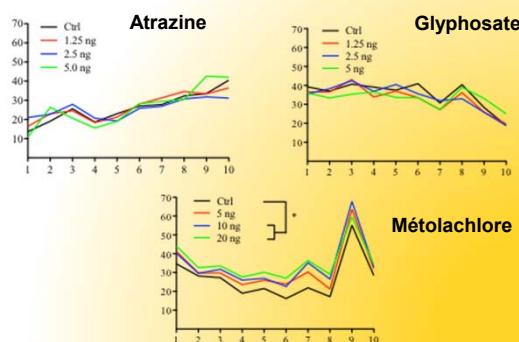
SPSS 16.0

SPSS 18.0

SPSS 18.0

Résultats 1/6

Consommation moyenne de sirop par abeille



Résultats 2/6

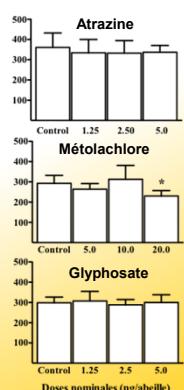
Survie des abeilles

Herbicide	Dose nominale (ng/abeille)	Survie (%)	χ^2	Probabilité
Atrazine	Control	97.6 ± 1.4	0.60	$p=0.89$
	1.25	97.2 ± 3.2		
	2.5	98.1 ± 1.7		
	5.0	98.1 ± 2.8		
Métolachlore	Control	89.8 ± 5.7	1.55	$p=0.67$
	5.0	86.5 ± 11.0		
	10.0	86.6 ± 17.9		
	20.0	83.7 ± 18.9		
Glyphosate	Control	92.5 ± 7.9	6.28	$p=0.10$
	1.25	97.0 ± 3.7		
	2.5	97.1 ± 2.1		
	5.0	96.9 ± 2.1		

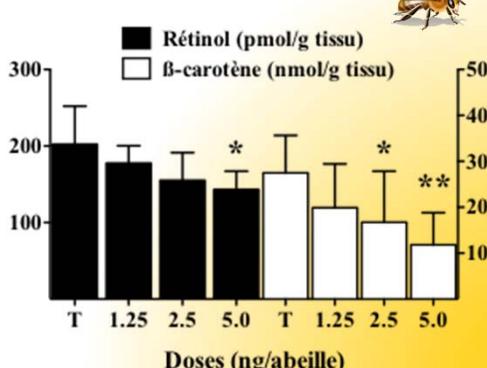
Résultats 3/6

Peroxydation des lipides TBARS (g tissu)

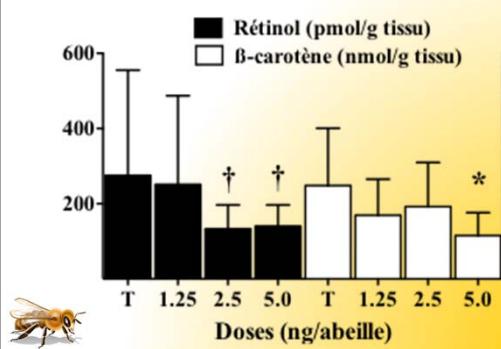
Métolachlore:
 ↑ Métabolisme glucose
 ↓ Triglycérides
 ↓ Lipoprotéines
 ↑↑ nourriture



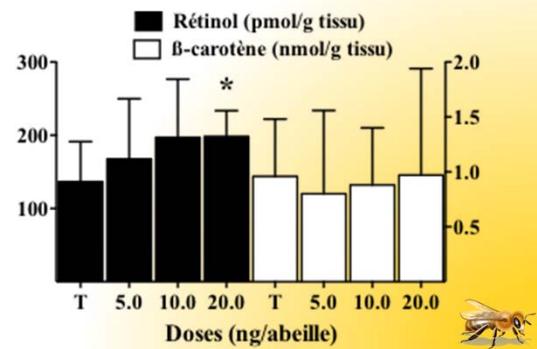
Résultats 4/6 - Atrazine

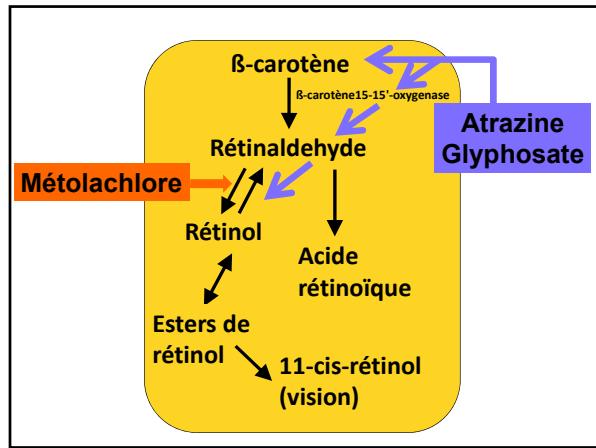


Résultats 5/6 - Glyphosate



Résultats 6/6 - Métolachlore





Conclusions...



Métolachlore ↑ métabolisme
Mesure des lipides/triglycéride?
Atrazine-Métolachlore-Glyphosate
Altération des rétinoïdes

Résultats similaires en champs?

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-014-2879-7

CROP PROTECTION: ENVIRONMENT, HUMAN HEALTH, AND BIODIVERSITY

Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*)

Stephanie Hedrei Helmer · Anahí Kerbaol ·
Philippe Aras · Catherine Jumarie · Monique Böily

Received: 13 January 2014 / Accepted: 2 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Collaborateurs

Club Agri-environnemental d'Argenteuil
(Philip Lavoie et Donna Clark)
Club Bio-Action (Yveline Martin)
MDDEFP, Direction du secteur agricole et des pesticides
Fédération des Apiculteurs du Québec (FAQ)

Programme de Soutien à l'Innovation et à l'Agroalimentaire (PSIA), MAPAQ