

Impact de la clothianidine sur le microbiote intestinal des abeilles et formulation de probiotiques pour contrer les interactions synergiques pesticide-microbiote chez l'Abeille mellifère, *Apis mellifera*

Sarah El Khoury, Jeff Gauthier, Bachar Cheaib, Pierre-Luc Mercier,  
Pierre Giovenazzo, Nicolas Derome

**No de projet :** IA115285

**Durée :** 07/2015 – 03/2019

### **FAITS SAILLANTS**

Le déclin des colonies d'abeilles mellifères est un sujet de préoccupation majeure depuis les dernières décennies. En raison de leur importance en tant que pollinisateurs agricoles, la surexploitation des agroécosystèmes a un impact négatif sur les colonies d'abeilles partout dans le monde. Les abeilles mellifères sont confrontées à une multitude de facteurs de stress en interaction synergique qui affectent leur durée de vie, leur santé et leur productivité. Parmi ces facteurs, les insecticides néonicotinoïdes, tel que la clothianidine, agissent sur le système nerveux central des Insectes, ciblant spécifiquement les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, induisant des altérations du comportement, de la mémoire et du système immunitaire. De plus, ces perturbations augmentent l'impact négatif de divers agents pathogènes. Il est maintenant bien documenté que les fonctions associées à la réponse immunitaire et au comportement sont contrôlées par le microbiote intestinal (i.e. microorganismes intestinaux) chez les Insectes. Étant donné que les néonicotinoïdes sont persistant dans l'environnement et principalement stable à l'hydrolyse, il est urgent d'élaborer des stratégies alternatives, efficaces et durables pour atténuer leurs effets délétères sur les abeilles.

Le présent projet propose deux livrables : (1) un prototype d'outil de bio-surveillance des colonies d'abeilles basé sur des biomarqueurs microbiens sensibles à l'exposition à des doses sous-létales de clothianidine, un pesticide majoritairement utilisé au Canada ; (2) Une formulation d'un supplément probiotique composé de symbiotes clés de l'abeille qui aidera à restaurer les propriétés métaboliques et protectrices de la flore intestinale de l'abeille dans un contexte d'exposition aux néonicotinoïdes.

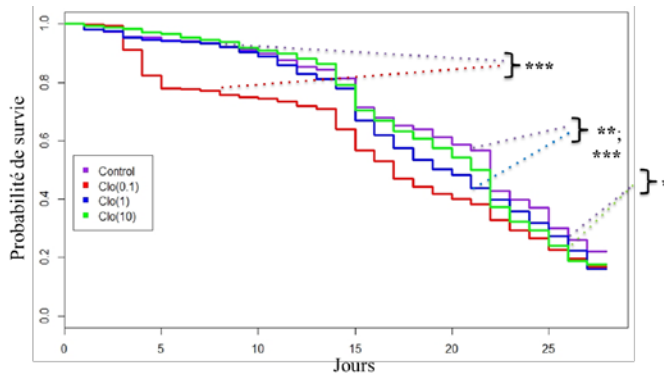
### **OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE**

Le premier objectif du projet consistait à mesurer l'impact de l'exposition à la clothianidine sur l'activité de la flore intestinale d'*Apis mellifera*. Des mesures en termes de survie, de consommation de sirop, de comportement et d'intégrité fonctionnelle du microbiote intestinal ont été mesurées. Trois concentrations (0,1 ; 1 et 10 ppb) et différentes parties intestinales ont été testées. Le second objectif consistait à isoler des souches bactériennes endogènes (candidats probiotiques) du tractus intestinal d'*Apis mellifera* pour sélectionner des bactéries capables 1) de croître au contact de la clothianidine et 2) de la dégrader en métabolites non toxiques. Le troisième objectif consistait à tester le potentiel des bactéries sélectionnées permettant d'aider à restaurer les fonctions clés du microbiote intestinal d'*Apis mellifera* en conditions *in vivo*. Concernant la méthodologie, des études *in vivo* ont été menées au CRSAD, des tests *in vitro* à l'IBIS et des mesures de quantification du pesticide à l'INRS. Pour finir, des approches génomiques et bio-informatiques ont été nécessaires pour l'analyse des résultats.

## RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

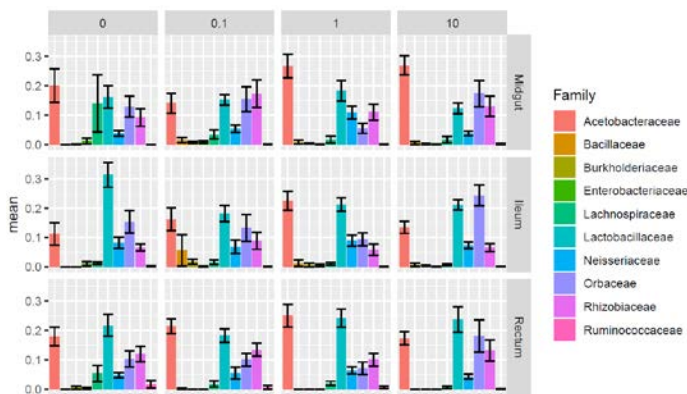
Environ une page, y compris tableaux, graphiques ou illustrations en autant que possible, et la section suivante « APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ».

- Le premier objectif du projet a montré que la clothianidine exerce un impact négatif sur l'activité du microbiote intestinal des abeilles mellifères qui se traduit par une modification complète de la contribution fonctionnelle de chaque taxon bactérien et une restructuration totale de leurs interactions. Aussi, la plus faible concentration (0,1 ppb) a montré l'impact le plus négatif sur la probabilité de survie des abeilles avec un taux de mortalité plus élevé comparé aux groupes expérimentaux à 1 et 10 ppb (**Figure 1**).

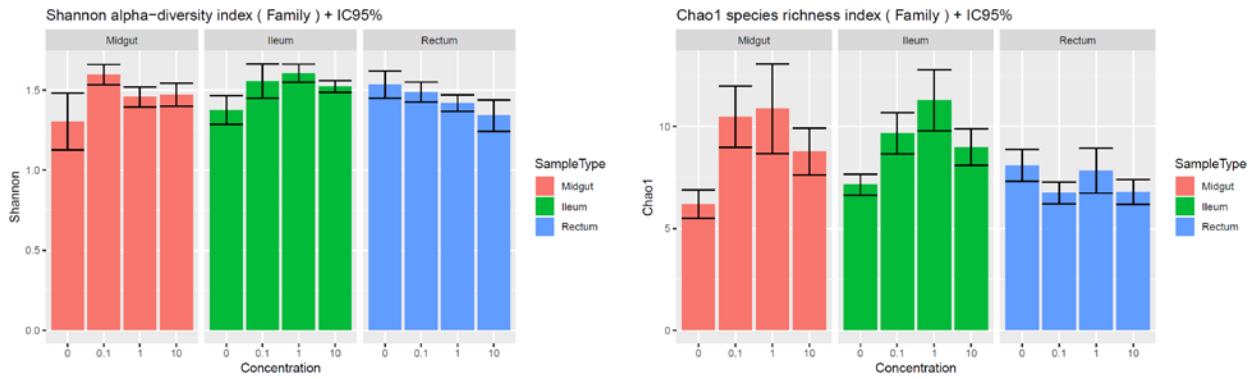


**FIGURE 1** | Courbes de survie de Kaplan-Meier de la distribution des abeilles dans chaque groupe expérimental sur 28 jours. L'axe des Y représente l'estimateur de la probabilité de survie de Kaplan-Meier. L'axe des X représente les jours expérimentaux. Modèle coxph implémenté dans le Paquet «survie» dans R, tel que \*\*\* P <0,001.

De plus, les trois concentrations (0,1 ; 1 et 10 ppb) testées ont induit une modification de la diversité spécifique du microbiote intestinale (diversité alpha), pour chacune des trois concentrations testées et dépendamment des différentes parties intestinales de l'abeille mellifère (**Figure 2 et 3**).

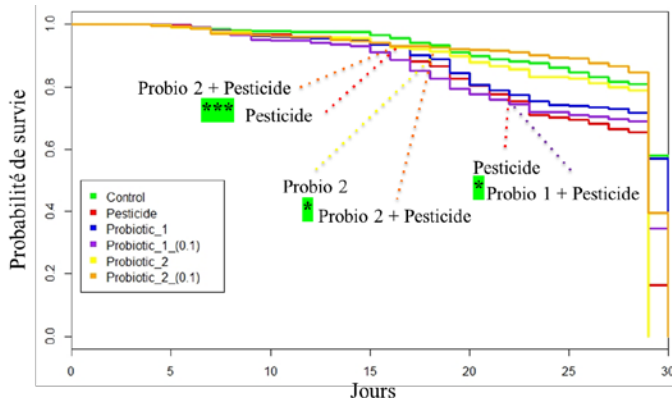


**FIGURE 2** | Histogramme montrant l'abondance des top rangs taxonomiques (n = 10 familles) pour le rang famille chez les abeilles témoins et exposées à 0,1; 1 et 10 ppb à 7 jours après administration du traitement. Les données sont subdivisées en fonction de deux conditions: la partie intestinale et la concentration. Chaque couleur représente une combinaison de la moyenne (en prenant en compte la totalité de l'ensemble de données) du nombre d'occurrences du rang famille, accompagnée de l'erreur type (estimation de la précision de l'estimation moyenne). Chaque colonne représente n = 50 abeilles.



**FIGURE 3** | Boxplots montrant l'indice de diversité de Shannon (à gauche) et de Chao1 (à droite) en fonction des différentes parties intestinales et des trois concentrations (0; 0.1; 1 and 10 ppb). Chaque boxplot représente la moyenne de la proportion relative de toutes les unités taxonomiques dans chaque compartiment intestinal d'abeilles tel que  $n = 50$  abeilles. Les colonnes roses représentent la diversité spécifique alpha de l'intestin moyen (midgut). Les colonnes vertes représentent la diversité spécifique alpha de l'illéum (ileum); et les colonnes bleues représentent la diversité spécifique du rectum. Chaque colonne est accompagnée de la moyenne de l'erreur type. Des comparaisons multiples entre chaque concentration et chaque compartiment intestinal ont été effectuées à l'aide du test de Tukey, telles que  $*** P < 0,001$ .

- Dans la seconde partie du projet, nous avons mis en évidence 7 bactéries (parmi 69 souches isolées) capables de dégrader complètement la clothianidine. Dans la dernière partie du projet, nous avons testé deux candidats probiotiques (sélectionnés parmi les 7 bactéries isolées). Nos résultats ont mis en évidence que les candidats probiotiques testés sont prometteurs pour le développement d'une formulation probiotique atténuant l'impact négatif de l'exposition aux néonicotinoïdes sur les colonies d'abeilles. Plus spécifiquement, l'administration de l'un de nos probiotiques a significativement amélioré le taux de survie des abeilles exposées à la clothianidine par rapport au groupe contrôle (administration de sucre (1:1)). (**Figure 4**).



**FIGURE 4** | Courbes de survie de Kaplan-Meier de la distribution des abeilles dans chaque groupe expérimental sur 28 jours. L'axe des Y représente l'estimateur de la probabilité de survie de Kaplan-Meier. L'axe des X représente les jours expérimentaux. Modèle coxph implémenté dans le Paquet «survie» dans R, tel que  $*** P < 0,001$ .

## APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE ET/OU SUIVI À DONNER

Ce projet (1) aborde des questions liées au déclin des abeilles, problème d'une importance primordiale, compte tenu de leur considérable impact environnemental, économique et de sécurité alimentaire ; (2) participe à la transformation de notre modèle agricole actuel, basé sur l'utilisation intensive de produits chimiques vers un système agro-écologique qui sera directement bénéfique pour la sécurité alimentaire et les composantes biotiques et abiotiques de la biodiversité. Ainsi, à terme, ce projet propose deux livrables : (1) un prototype d'outil de bio-

surveillance des colonies d'abeilles basé sur des biomarqueurs microbiens sensibles à l'exposition à des doses sous-létales de clothianidine, un pesticide majoritairement utilisé au Canada ; (2) Une formulation d'un supplément probiotique composé de symbiotes clés de l'abeille qui aidera à restaurer les propriétés métaboliques et protectrices de la flore intestinale de l'abeille dans un contexte d'exposition aux néonicotinoïdes. De plus, la formulation de symbiotes clés de l'abeille pourra être utilisée à titre curatif et/ou préventif par les apiculteurs. De plus, nous avons basé notre travail sur la formulation des probiotiques composée de bactéries aérobies afin de permettre une production efficace et facilement reproductible au laboratoire par les industries. Ces deux livrables doivent être mis à l'échelle industrielle, c'est à dire testés sur des colonies d'abeilles en ruchers expérimentaux (*in situ*).

#### **POINT DE CONTACT POUR INFORMATION**

Nom du responsable du projet : Nicolas Derome

Téléphone : 418 656 7726

Télécopieur : 418 656 2043

Courriel : [nicolas.derome@bio.ulaval.ca](mailto:nicolas.derome@bio.ulaval.ca)

#### **REMERCIEMENTS AUX PARTENAIRES FINANCIERS**

Ces travaux ont été réalisés grâce à une aide financière du Programme de soutien à l'innovation en agroalimentaire, un programme issu de l'accord du cadre Cultivons l'avenir conclu entre le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.