Proposition de projet dans le cadre de l'appel d'offres interne ECCOREV 2013

Axe 3 - Ecodynamique et toxicologie environnementale

Etude des effets des rayonnements ionisants sur l'abeille

IRSN (LECO) : Béatrice GAGNAIRE
INRA (LTE) : Luc BELZUNCES

1. Contexte de la recherche (maximum une page) : bien stipuler l'axe de rattachement

La protection de l'environnement dans un contexte de changements globaux et dans la perspective de la gestion durable des ressources et des milieux naturels fait partie des objectifs prioritaires de la Communauté Européenne. La pollution des milieux est un problème majeur tant pour la population humaine que pour les populations végétales et animales[1]. L'altération d'une ou plusieurs fonctions biologiques est susceptible de modifier l'homéostasie et la capacité d'adaptation de ces organismes avec pour conséquence la remise en cause de leur croissance, de leur reproduction, voire de leur survie. Cependant, les effets à des niveaux hiérarchiques élevés sont toujours précédés de changements précoces dans les processus biologiques, permettant le développement de biomarqueurs d'alerte précoce d'effets chez les individus. Le développement de ces outils diagnostiques est primordial dans le cadre de l'évaluation des risques en écotoxicologie[2].

L'émission de rayonnements ionisants (RI), assimilée à un stress physique, est un phénomène naturel et ubiquiste (radioactivité naturelle comprise entre 0,022 et 0,18 µGy/h suivant la zone géographique) auquel s'ajoute une radioactivité artificielle générée par les activités humaines (fonctionnement des installations du cycle du combustible, rejets issus des activités industrielles et de la médecine nucléaire, sites de stockage, retombées des essais et de Tchernobyl)[3]. Cette radioactivité peut aller jusqu'à plus de 100 µGy/h en contexte accidentel[4]. Il a été récemment suggéré, sur la base de modèles d'extrapolation statistique, que des débits de dose de 10 µGy/h pouvaient être considérés comme acceptables pour la protection des écosystèmes aquatiques[5]. Néanmoins, il paraît intéressant d'acquérir des données sur les potentiels effets des RI à des doses inférieures à cette valeur seuil.

Les propriétés écotoxiques des RI sont relativement peu étudiées chez les organismes non-humains. Les connaissances de la toxicologie des RI chez les invertébrés telles que les abeilles sont très limitées : quelques données de bioaccumulation de certains radionucléides peuvent être recensées dans la littérature[6,7,8,9]. Aucune information n'est disponible concernant les mécanismes de toxicité, les effets précoces et sublétaux de l'exposition aux RI chez l'abeille. Une meilleure connaissance des interactions entre ces polluants et les invertébrés à des concentrations pertinentes d'un point de vue environnemental est donc nécessaire afin de prédire les potentielles conséquences liées à l'exposition aux RI.

De façon générale, l'impact le plus précoce d'un polluant se produit à l'échelle cellulaire. Les composés toxiques peuvent causer, directement ou indirectement, des effets nuisibles sur les principaux systèmes physiologiques, notamment le système immunitaire et les mécanismes anti-inflammatoires, la lutte contre le stress oxydant, le métabolisme général et de détoxication ainsi que l'activité neurale.

Dans ce contexte, ce projet propose d'utiliser l'abeille domestique, *Apis mellifera*, comme modèle pour étudier l'effet des RI sur les différentes fonctions physiologiques précitées. L'abeille constitue un modèle biologique terrestre d'importance économique, agro-environnementale et scientifique. Au niveau économique, l'abeille permet l'apport de revenus

---

[1] GALLOWAY, T.S., DEPLEDGE, M.H. 2001. Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. Ecotoxicology, 10(1): p. 5-23.

[2] SANCHEZ, W., PORCHER, J-M. 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 28(2): p. 150-158.

[3] UNSCEAR 1996. Sources and effects of ionising radiation, report for the general assembly, ed. U. Nations. New York.

[4] GASCHAK, S.P., MAKLYUK, Y.A. MAKSIMENKO, A.M. BONDARKOV, M.D. JANNIK, G.T., FARFÃ¡N, E.B. 2011. Radiation ecology issues associated with murine rodents and shrews in the Chernobyl Exclusion Zone. Health Physics, 101(4): p. 416-430.

[5] GARNIER-LAPLACE, J., DELLA-VEDOVA, C. GILBIN, R. COPPLESTONE, D. HINGSTON, J., CIFFROY, P. 2006. First derivation of predicted-no-effect values for freshwater and terrestrial ecosystems exposed to radioactive substances. Environmental Science and Technology, 40(20): p. 6498-6505.

[6] FRESQUEZ, P.R. ARMSTRONG, D.R. PRATT L.H. 1996. Radionuclides in bees and honey within and around los alamos national laboratory authors. Journal of Environmental Science and Health, part A, 32 (5), 1309–1323.

[7] HAARMANN, T.K. 1997. Honey bees as indicators of radionuclide contamination: Exploring colony variability and temporal contaminant accumulation. Journal of Apicultural Research, 36 (2), 77–87.

[8] HAARMANN, T.K. 1998. Honey bees as indicators of radionuclide contamination: Comparative studies of contaminant levels in forager and nurse bees and in the flowers of three plant species. Archives of Environnemental Contamination and Toxicology, 35, 287–294.

[9] HAKONSON, T.E. BOSTICK, K.V. 1975. The availability of environmental radioactivity to honey bee colonies at Los Alamos. Journal of Environmental Quality, 5 (3), 307–310.

substantiels à une branche de l'agriculture, l'apiculture, par la production de produits de la ruche à forte valeur ajoutée (miel, cire, pollen, gelée royale et propolis) et par la location des colonies pour la pollinisation. Au niveau agro-environnemental, l'abeille est l'un des principaux contributeurs à la pollinisation entomophile des plantes qui permet une amélioration des rendements qualitatifs et quantitatifs des productions de fruits et de légumes. De plus, par son activité pollinisatrice intense et par le prélèvement important d'eau pour les besoins de la colonie, l'abeille est en contact avec un grand nombre de polluants et de toxiques environnementaux. De ce fait, l'abeille est considérée comme un bio-indicateur de haute sensibilité de la qualité de l'environnent[10], représente une espèce modèle dans la procédure d'homologation des pesticides (règlement européen 1107/2009/CE et dans la directive 96/12/CE) et constitue une espèce protégée par la loi au niveau des pays membres de la communauté européenne et de l'OCDE. Au niveau scientifique, l'abeille fait partie des meilleurs modèles d'étude des fonctions cognitives (mémoire, apprentissage, vision, olfaction, orientation, reconnaissance physique). Enfin, l'abeille fait partie des organismes de références de la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique), ce qui en fait un modèle animal particulièrement intéressant à étudier dans le contexte de l'exposition aux rayonnements ionisants. Les abeilles ont d'ailleurs déjà été utilisées pour détecter la présence de radioisotopes dans l'environnement après la catastrophe de Tchernobyl et dans d'autres cas d'accidents industriels[11]. Enfin, différents biomarqueurs ont été mis au point sur ce modèle biologique qui permettent de mieux évaluer les impacts des stresseurs environnementaux[12,13].

Ce projet s'insère dans l'axe 3 d'ECCOREV : Ecodynamique et toxicologie environnementale.

2. Objectifs de la demande (maximum une page) incluant la description de la suite prévue pour le projet

L'objectif général de ce projet est d'améliorer la connaissance des effets et des mécanismes d'actions des RI sur la physiologie de l'abeille dans un contexte de contamination chronique (i.e. une exposition d'une durée significative par rapport à la durée de vie de l'organisme exposé) et à faible dose (domaine d'écotoxicité subtoxique). En effet, très peu de données existent sur ce sujet et il paraît légitime d'initier des études qui constitueront une base de travail pour mieux évaluer les impacts des RI sur les abeilles.
L'objectif du projet proposé est de coupler les compétences de l'INRA (maîtrise du modèle biologique, analyse de biomarqueurs) et de l'IRSN (maîtrise de l'exposition radiologique, dispositif d'irradiation à des doses croissantes de rayonnements gamma, génotoxicité) afin d'étudier l'impact des rayonnements ionisants sur les abeilles. Une expérience pilote, sur les effets physiologiques des rayonnements ionisants chez l'abeille adulte, a été réalisée récemment. Les analyses de la batterie de biomarqueurs suivie par l'INRA sont en cours. Le projet proposé, par le biais d'un étudiant de Master II, permettra de confirmer les résultats et d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action en prenant en compte notamment les stades précoces de développement.

Ce projet de recherche est original à plusieurs égards. Il propose (i) d'établir une base de connaissances sur les mécanismes d'action des RI chez l'abeille et (ii) de mettre en relation les réponses observées à l'échelle de la cellule avec des processus intégrateurs au niveau individuel par le biais d'expériences de comportement. Ce lien entre différentes échelles d'organisation biologique permettra de mieux appréhender les effets potentiellement toxiques des RI chez l'abeille.

---

[10] THOMSON H.M., MAUS C. 2007. Perspective - The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. Pest Management Science, 63: 1058-1061.
[11] PORRINI, C. 2008. Les abeilles utilisées pour détecter la présence de radio-isotopes dans l'environnement. Bulletin Technique Apicole, 35 (4), 165–167.
[12] BADIOU A., MELED M. and BELZUNCES L.P. 2008. Honeybee Apis mellifera acetylcholinesterase - a biomarker to detect deltamethrin exposure. Ecotoxicol Environ Safety 69, 246-253.
[13] BADIOU-BÉNÉTEAU A, CARVALHO S.M., BRUNET J-L., CARVALHO G.A., BULETÉ A., GIROUD B., BELZUNCES L.P. 2012. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee Apis mellifera: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. Ecotoxicology and Environmental Safety 82: 22-31.

Les résultats attendus à l'issue de cette étude auront plusieurs finalités :
- caractériser les cibles précoces des RI sur un modèle biologique représentatif des écosystèmes terrestres, l'abeille domestique
- caractériser les biomarqueurs les plus sensibles à une exposition à des RI
- déterminer des valeurs seuils induisant des effets sublétaux sur la physiologie des abeilles irradiées ayant possiblement des conséquences sur leurs traits d'histoire de vie
- établir le lien entre les affections potentielles des fonctions physiologiques étudiées et les fonctions régissant le maintien la cohésion sociale de la colonie et de l'espèce, notamment la survie
- établir le lien entre les différents niveaux d'organisation biologique (réponses obtenues au niveau cellulaire et individuel)
- obtenir des outils d'aide à la caractérisation et l'évaluation du risque radiologique encouru par les organismes et les écosystèmes

A plus long terme, il est envisagé de poursuivre ces recherches dans le cadre d'un projet de plus grande envergure (ANR) en incluant des partenaires privés (APINOV) afin d'utiliser les abeilles (biomarqueurs, épreuve d'exploration fonctionnelle, dosage des radionucléides) et les ruches (suivi de l'activité de la colonie) comme moyen de surveillance de l'environnement sur des sites contaminés (Tchernobyl, Fukushima) et à proximité de centrales nucléaires et d'anciennes mines d'uranium en France.

3. Réalisations prévues, plan financier succinct (une à deux pages), description courte du mode d'interaction prévu entre les équipes.

Méthodologie

L'IRSN est doté d'un dispositif permettant des irradiations gamma à doses croissantes (0-0,3-0,6-3-6,3-31-62-250-550 mGy/jour). Une première expérience a été réalisée en septembre 2012 en mettant au contact des abeilles ouvrières à ces doses pendant 15 jours afin d'étudier l'effet des rayonnements sur les animaux. La survie et la prise de nourriture ont été suivies quotidiennement. Des analyses d'une batterie de biomarqueurs développés par l'INRA (stress oxydatif, immunotoxicité, neurotoxicité, métabolisme) sont en cours.
Le projet propose de reproduire l'expérience en s'inspirant des résultats précédemment acquis et de poursuivre l'étude sur les doses les plus pertinentes pendant une plus longue durée. Huit cagettes de dimensions 8 x 5 x 4 cm (L x l x h) seront placées dans chaque irradiateur, avec 25 abeilles par cagette, soit 200 abeilles par irradiateur (x 5 doses = 1000 abeilles au total). Dans chaque irradiateur, 4 cagettes seront placées en cercle à proximité immédiate de la source afin d'obtenir la gamme haute d'irradiation (0,6-6,3-62-550 mGy/jour) et 4 cagettes seront placées en cercle derrière le premier cercle afin d'obtenir la gamme basse d'irradiation (0,3-3-31-250 mGy/jour) (Figure 1). En effet, le débit de dose d'un rayonnement est inversement proportionnel au carré de la distance qui l'éloigne de la source, donc plus les cagettes sont proches de la source, plus la dose reçue sera importante (et inversement). Les mêmes paramètres que dans l'expérience pilote seront étudiés : survie, prise de nourriture, batterie de biomarqueurs (neuraux : acétylcholinestérase, carboxylestérases 1-3, cytochrome c oxydase _ immunitaires : glucose oxydase, phospholipase, phénoloxydase – métaboliques : phosphatase alcaline, ECOD, ATP, glutathion-S-transférase, protéases – Stress oxydant : Superoxyde dismutase, catalase, glutathion réductase, glutathion peroxydase). La génotoxicité des RI sera abordée par le test des comètes. D'autre part, une exposition de larves sera réalisée, étant donné la sensibilité plus importante des stades précoces. Les larves seront issues d'œufs pondus dans la ruche et récupérés trois jours après la ponte. Les larves seront nourries *in vitro* au moyen d'une nourriture synthétique qui permet leur développement jusqu'à l'âge adulte[14].

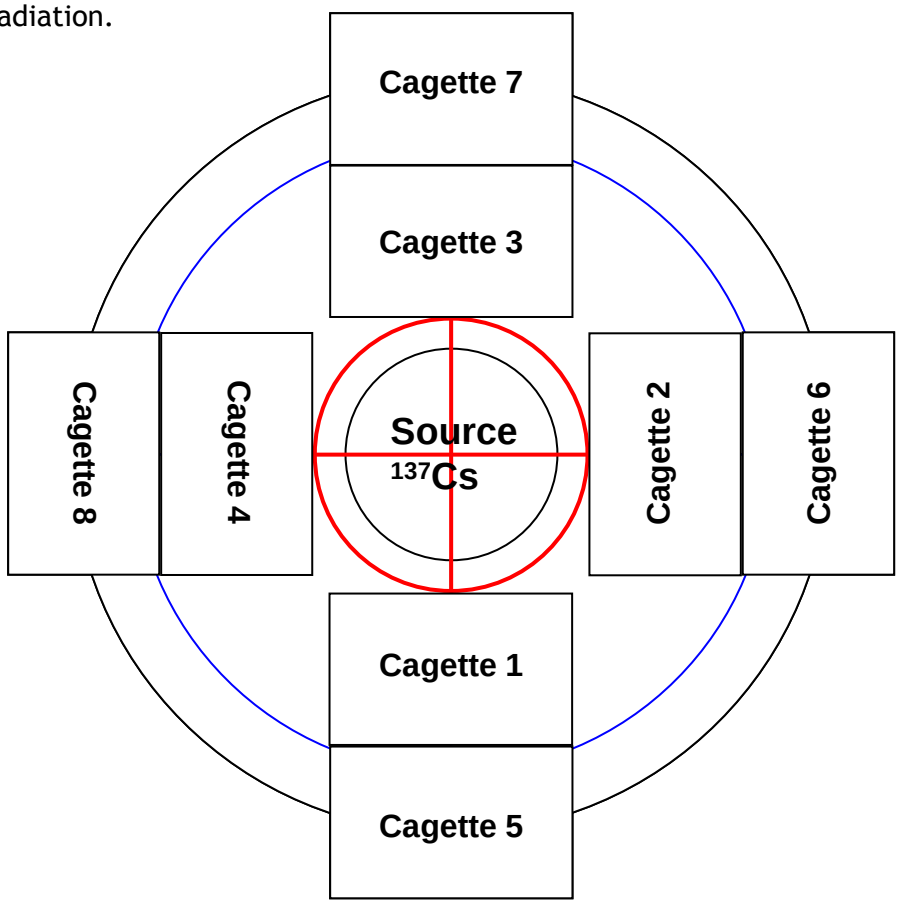
L'étude des effets d'irradiation externe gamma sera associée à des calculs et des mesures par dosimètres RPL (Radio-Photo-Luminescent) qui permettent de maîtriser avec précision les doses délivrées aux organismes exposés.

[14] HENDRIKSMA HP, HAERTEL S, STEFFAN-DEWENTER I. 2011. Honey bee risk assessment: new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses. Methods in Ecology and Evolution 2: 509-517.

Après irradiation, une partie des abeilles sera utilisée pour étudier les altérations physiologiques dues aux RI, par analyse de biomarqueurs physiologiques, et une partie sera utilisée pour effectuer des épreuves d'exploration fonctionnelle portant sur les capacités mnésiques, l'activité de butinage, la capacité et le réflexe de vol.

L'analyse des réponses biologiques sera conduite à l'échelle individuelle en privilégiant la recherche des atteintes des grandes fonctions (survie, reproduction, croissance, comportement) et à l'échelle sub-individuelle (biomarqueurs) pour comprendre et affiner les réponses observées.

Figure 1 : schéma du dispositif de positionnement des cagettes dans les incubateurs. Cagettes 1, 2, 3, 4 : exposées à la gamme haute d'irradiation ; cagettes 5, 6, 7, 8 : exposées à la gamme basse d'irradiation.



Budget demandé
Salaire d'un Master 2 sur 6 mois : 4500€
Missions : 500€ (déplacements Cadarache-Avignon pour transporter les abeilles et analyser les biomarqueurs – réunions d'avancement)
Matériel : 1000€ (cagettes, pollen, tubes, réactifs pour biomarqueurs)

4. Description du consortium : liste des participants (avec leur statut et le pourcentage d'implication), court CV du porteur de chaque équipe incluant la liste de trois publications les plus pertinentes pour le projet.

Equipes concernées
1- IRSN/PRP-ENV/SERIS/LECO (Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides) – Cadarache
Béatrice Gagnaire (chercheur – 20%)
Isabelle Cavalié (technicienne – aide sur les expérimentations – 10%)

Nicolas Dubourg (responsable technique – calcul de doses – 10%)

2- INRA LTE (Laboratoire de Toxicologie Environnementale) – Avignon
Luc Belzunces (Directeur de recherche – 20%)
Jean-Luc Brunet (chercheur – 15%)
Sylvie TCHAMITCHIAN (technicienne – aide sur les mesures de biomarqueurs – 20%)

CV du porteur de projet pour le LECO :
Le Laboratoire d'Ecotoxicologie des Radionucléides (LECO) dispose des installations adaptées pour conduire des expérimentations en présence de radionucléides. Il est équipé d'un système d'irradiation gamma à faible dose.
Béatrice Gagnaire travaille à l'IRSN depuis mars 2008. Ses activités de recherche font partie du programme de recherche interne ENVIRHOM. Ce projet, débuté en 2001, a pour but d'améliorer les méthodologies et les connaissances associées afin de rendre possible l'évaluation du risque à l'homme et aux écosystèmes pour des situations d'expositions chroniques à faibles doses à des contaminants (métaux et substances radioactives) de l'homme et de l'environnement. Les activités de recherche de Béatrice Gagnaire sont centralisées autour de l'étude des effets des radionucléides principalement sur le système immunitaire, mais également sur le comportement et le budget énergétique (théorie DEB) chez le poisson zèbre et chez le gardon, notamment dans le cadre d'une thèse co-financée par l'INERIS débutée fin 2012.

Liste des publications :
1. Gagnaire B., Cavalié I., Camilleri V., Adam-Guillermin C. (in press). Effects of depleted uranium on oxidative stress, detoxification and defence parameters of zebrafish, Danio rerio. Archives of Environmental Contamination and Toxicology.
2. Gagnaire B., Adam-Guillermin C., Bouron A., Lestaevel P. (2011). The effects of radionuclides on animal behaviour: a review. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology, 210:35-58.
3. Gagnaire B., Gagné F., André C., Blaise C., Abbaci K., Budzinski H. Devier M.-H. & Garric J. (2009). Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquatic Toxicology, 92 (3): 155-167.

CV du porteur de projet pour le LTE :
Le Laboratoire de Toxicologie Environnementale (LTE) est spécialisé dans l'étude des effets et des modes d'action des toxiques sur les invertébrés terrestres et l'abeille en particulier. Il développe une approche pluridisciplinaire qui combine des compétences de biochimie, biologie cellulaire, neurobiologie et pharmacocinétique et permet d'étudier les effets des toxiques de l'échelle sub-cellulaire à l'échelle de l'individu.
Luc Belzunces, Directeur de Recherche HDR, est responsable du Laboratoire de Toxicologie Environnementale. Il a été Directeur de l'UMR 406 Abeilles & Environnement de 2003 à 2009. Il travaille depuis 28 ans sur les effets des stresseurs environnementaux chez l'abeille. Il est expert toxicologue et écotoxicologue à l'ANSES, l'ANSM, l'OCDE et l'OEPP. Il a publié 65 articles (dont 2 soumis et 1 en révision).

Liste des publications :
1. VIDAU C, BRUNET JL, BADIOU A and **BELZUNCES** LP (2009) Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicol in Vitro* 23, 589-597.
2. BADIOU A., MELED M. and **BELZUNCES** L.P. (2008) Honeybee Apis mellifera acetylcholinesterase - a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicol Environ Safety* 69, 246-253.
3. BADIOU A, CARVALHO SM, BRUNET JL, CARVALHO GA, BULETE A, GIROUD B and **BELZUNCES** LP (2012) Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Safety* 82, 22–31. http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005

5. Si vous avez déjà bénéficié d'un financement ECCOREV pour un projet intérieur, ajouter la liste à jour des publications, colloques, opérations de vulgarisation effectuées à la suite de ce projet. Fournir un pdf des publications.

Un financement a été obtenu par ECCOREV pour l'achat d'un cytomètre de flux du LECO en 2010, mais il n'y a pas encore de publication associée à cet équipement.