

Les abeilles mellifères protègent leurs larves contre les toxines contenues dans le pollen en produisant de la gelée larvaire

Flavie Roncoroni, Matteo Lucchetti, Verena Kilchenmann et Christina Kast Agroscope, Centre de recherche apicole, 3003 Berne

Au cours de leur évolution, les plantes ont développé divers métabolites secondaires, qui sont des composés chimiques utilisés notamment pour la défense contre d'autres organismes. Ces substances sont donc souvent toxiques pour les animaux et les hommes. On les trouve dans les différentes parties des plantes, par exemple les racines, les feuilles et surtout les fleurs. Le nectar et le pollen peuvent également contenir ces substances chimiques. Lorsque les abeilles butinent les plantes en fleurs pour récolter leur nectar ou pollen, elles transportent ces substances toxiques dans la colonie. Matteo Lucchetti a découvert au cours de son travail de doctorat chez Agroscope et à l'Université de Neuchâtel que ces substances végétales affectent le développement des abeilles. Cependant, en produisant de la gelée larvaire, les abeilles sont capables de protéger leurs larves contre les toxines contenues dans le pollen. Nous présentons ici les résultats publiés dans la revue scientifique «Proceedings of the Royal Society B»^[1].

Le pollen contient souvent une concentration particulièrement élevée de métabolites secondaires et présente donc un risque pour les abeilles lorsqu'elles rapportent du «pollen toxique». Dans la colonie, le pollen récolté est mélangé à du miel, du nectar et des sécrétions glandulaires, puis stocké dans les rayons sous la forme de pain d'abeilles. Les jeunes abeilles fraîchement émergées consomment beaucoup de pain d'abeilles. Celui-ci sert de source de protéines, entre autres pour le développement des glandes hypopharyngiennes et de la musculature des ailes^[2]. Les métabolites secondaires présents dans le pollen peuvent donc avoir un effet négatif direct sur les jeunes abeilles.

Les nourrices consomment également du pain d'abeilles pour produire de la gelée larvaire destinée aux larves d'ouvrières et de faux bourdons. La composition de la gelée larvaire destinée aux ouvrières est très semblable à celle de la gelée royale, la nourriture réservée aux larves de reine. Pendant les trois premiers jours, la gelée larvaire ne contient presque pas de pollen et ensuite très peu^[3]. Par conséquent, les larves de l'abeille mellifère ne sont pratiquement pas en contact direct avec le «pollen toxique». Cependant, les métabolites secondaires présents dans le pollen pourraient avoir un effet indirect sur les larves, si ces toxines parviennent dans la gelée larvaire.

La vipérine commune, plante modèle pour les métabolites secondaires contenus dans le pollen

Pour étudier cette problématique, nous avons choisi la vipérine commune (*Echium vulgare*, figure 1). Cette plante est très répandue en Suisse, produit de grandes quantités de pollen et de nectar et est une plante mellifère très appréciée des abeilles, qui a en plus une longue période de floraison (mai à octobre). La vipérine commune contient des alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP) comme métabolites secondaires, par exemple l'échimidine ou l'échivulgarine. En Suisse, la vipérine commune est la principale cause de la présence indésirable d'AP dans les produits apicoles, comme le miel et le pollen [4;5]. En effet, son pollen contient des teneurs particulièrement élevées en AP [6].



Figure 1 : la vipérine commune (*Echium vulgare*) est très appréciée des abeilles qui la butinent très souvent. Or, elle produit des alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP). L'un de ces alcaloïdes est l'échimidine, qui a été isolée de la vipérine pour les besoins de cette étude.

Nos essais

Afin de tester la toxicité du pollen de vipérine pour les abeilles mellifères lors d'essais en laboratoire, Matteo Lucchetti a isolé différents AP des fleurs de vipérine. Les essais sur les abeilles décrits dans cet article ont tous été menés avec de l'échimidine. Elle a été isolée et ajoutée à du pollen exempt d'AP, à la nourriture des larves ou au pain d'abeilles. Plutôt que de diriger nos analyses vers la gelée larvaire d'ouvrière, dont les quantités produites sont faibles et qui peut ainsi difficilement être prélevée à des fins d'analyse, nous nous sommes intéressés à la gelée royale, permettant plus facilement l'analyse des sécrétions glandulaires.

Nous avons examiné les questions suivantes (voir figure 2) :

1. Les AP sont-ils toxiques pour les jeunes abeilles adultes ?
2. Les AP sont-ils toxiques pour les larves ?
3. Quelle est la teneur en AP que l'on retrouve dans la gelée royale ?

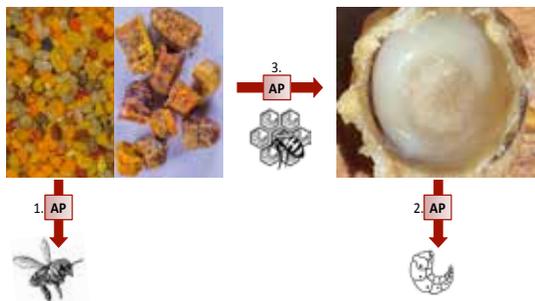


Figure 2 : L'échimidine, un AP produit par la vipérine commune, a été ajoutée à du pollen exempt d'AP et à la nourriture des larves afin d'étudier la toxicité de cet AP pour les abeilles adultes (1^{er} essai) et pour les larves (2^e essai). Quelle est la proportion d'AP qui passe du pain d'abeilles à la gelée royale (3^e essai) : l'échimidine a été ajoutée à du pain d'abeilles exempt d'AP. Les nourrices consomment du pain d'abeilles contenant des AP et produisent de la gelée royale. Après avoir déterminé la concentration d'AP dans la gelée, on peut déterminer l'éventuel effet de filtre.

1. Impacts sur les abeilles fraîchement émergées

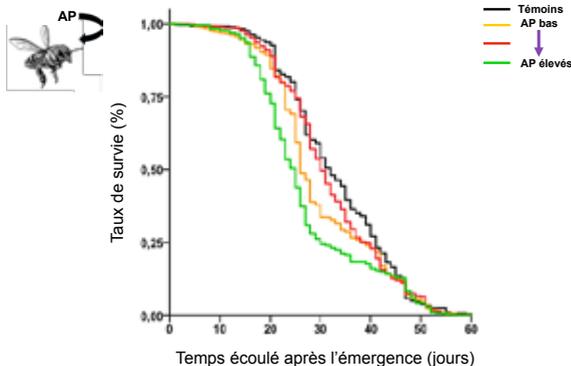


Figure 3 : Toxicité des AP pour les abeilles adultes. Témoins (courbe noire) et trois concentrations différentes d'échimidine dans le pollen : 0,2 mg/g (courbe jaune), 1,5 mg/g (courbe rouge) et 7,7 mg/g (courbe verte).

La concentration la plus élevée était similaire à la teneur naturelle totale en AP du pollen de vipérine. Les « cagettes Liebfeld » ont été placées dans un incubateur. Les abeilles mortes ont été comptées et enlevées chaque jour. Ces essais ont été répétés plusieurs fois et sont résumés dans la figure 3. Il en ressort que les abeilles adultes tolèrent relativement bien l'échimidine, car nous n'avons observé aucune augmentation du taux de mortalité durant les 15 premiers jours. Les abeilles ayant ingéré les deux doses d'échimidine les plus faibles (courbes jaune et rouge) ont présenté un taux de survie semblable à celui des abeilles témoins (noire ; aucune différence statistiquement significative par rapport aux courbes jaune et rouge). Cependant, nous avons observé une réduction du taux de survie des abeilles ayant ingéré la dose la plus élevée (courbe verte ; statistiquement significative).

2. Impacts sur les larves

Les tests larvaires (figure 4) ont été réalisés selon le protocole d'Aupinel et al. [7]. Différentes concentrations d'échimidine ont été ajoutées à la nourriture.

À une concentration de 15 µg/g d'échimidine (courbe bleu clair sur la figure 5), nous n'avons observé aucun effet négatif sur la survie des larves. Le taux d'émergence des abeilles après 21 jours était d'environ 75 % pour cette concentration et donc comparable à celui des larves témoins n'ayant pas ingéré d'échimidine (courbe noire ; taux d'émergence également d'environ 75 %).



Figure 4 : Test larvaire : les larves ont été nourries en laboratoire avec une préparation alimentaire composée de sucre, d'extrait de levure et de gelée royale, puis élevées en incubateur.

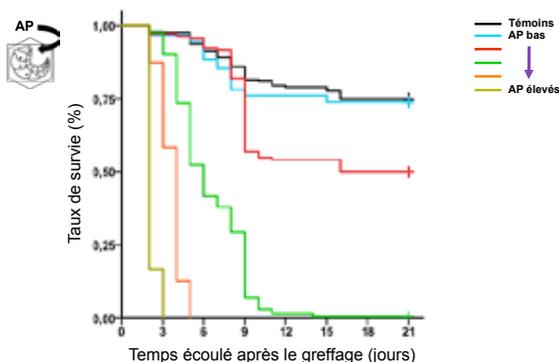


Figure 5: Toxicité des AP pour les larves. Témoins (courbe noire) et cinq concentrations différentes d'échimidine: 15 µg/g (courbe bleu clair), 20 µg/g (courbe rouge), 40 µg/g (courbe verte), 400 µg/g (courbe orange) et 4 000 µg/g (courbe vert olive).

À ces concentrations, seules quelques abeilles ont émergé, parfois même aucune. Contrairement aux abeilles adultes, les larves sont très sensibles à l'ajout d'AP dans leur nourriture.

3. Passage des AP du pain d'abeilles dans la gelée royale

Notre hypothèse, à savoir que «les soins aux larves protègent celles-ci des métabolites secondaires» est valable, dans le cas où la teneur en AP de la gelée royale (3^e essai) se situe dans une plage de concentration pour laquelle aucune réduction du taux d'émergence n'a été observée lors du test sur les larves (2^e essai). Pour étudier cette hypothèse, des essais ont été menés au moyen de systèmes Miniplus modifiés, qui sont des mini-colonies avec abeilles et réserves de nourriture, sans reine (figure 6).

De l'échimidine a été mélangée à du pain d'abeilles dans une concentration de 2000 µg/g (2 mg/g). Celui-ci a été introduit dans les cellules d'un rayon placé dans la mini-colonie. Des jeunes larves ont été transférées (greffées) dans des petites cupules et placées dans la mini-colonie afin que les abeilles tirent des cellules royales, dont nous avons pu extraire la gelée royale.

La gelée royale a été récoltée après trois jours et la teneur en échimidine déterminée. La concentration moyenne d'échimidine était de 2 µg/g (figure 7). Ainsi, la teneur moyenne en échimidine dans la gelée royale était nettement inférieure à 15 µg/g; il s'agit d'une concentration d'AP dans la nourriture des larves pour laquelle aucune réduction du taux d'émergence n'a été observée (figure 5, courbe bleu clair, semblable à la courbe témoin noire). Les nourrices agissent donc en quelque sorte comme un «filtre» pour les larves car, par la production de gelée larvaire, la concentration d'AP est réduite d'environ mille fois.



Figure 6: Système Miniplus modifié. Une cage avec filet délimite un espace de vol sans accès extérieur.

Évaluation des risques pour les abeilles adultes

Les abeilles adultes tolèrent relativement bien les toxines étudiées, car nous n'avons observé aucun symptôme aigu d'empoisonnement dans les premiers jours. Cependant, des teneurs élevées ont affecté le taux de survie. Si les abeilles récoltent exclusivement du pollen de vipérine, leur durée de vie peut être réduite. Or, comme les abeilles récoltent le pollen de diverses plantes à fleurs dans leur environnement naturel (on parle dans ce cas d'un insecte polylectique) et le stockent sous forme de pain d'abeilles, les pollens des différentes espèces de plantes sont mélangés et ainsi les éventuelles toxines diluées. En outre, une teneur élevée en AP peut avoir un effet répulsif sur les abeilles, de sorte qu'elles récolteront moins de pollen à très forte teneur en AP ^[8]. Pour ces raisons, le risque pour les abeilles adultes est probablement faible, si les colonies se trouvent dans un environnement avec des sources de nourriture variées.

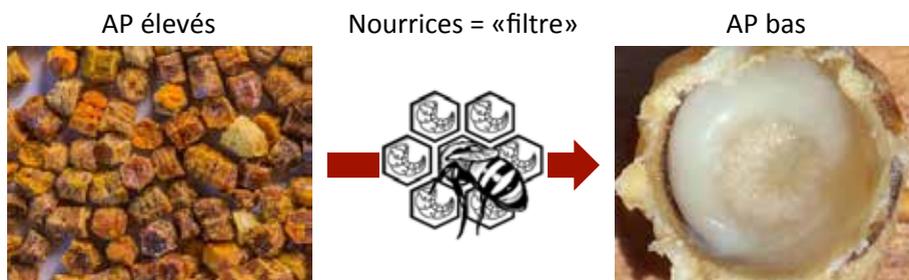


Figure 7: Les nourrices ont consommé du pain d'abeilles avec une concentration d'échimidine de 2000 µg/g et ont produit de la gelée royale. On a relevé dans celle-ci une concentration moyenne d'échimidine de 2 µg/g. Les abeilles fonctionnent comme des «filtres»: par la production de gelée, la concentration d'échimidine est réduite d'environ 1000 fois.

Évaluation des risques pour les larves

En revanche, même de petites quantités des toxines étudiées ont entraîné une réduction du taux d'éclosion. Les larves sont donc extrêmement sensibles aux AP. Cependant, comme la gelée larvaire contient très peu de pollen, elles ne sont pratiquement jamais exposées à ces toxines dans la colonie. Il est toutefois important de comprendre quelle quantité de toxines passe du pain d'abeilles à la gelée larvaire, afin de déterminer le risque réel pour la survie des larves. Nous avons pu démontrer que seule une petite fraction des AP présents dans le pollen et le pain d'abeilles passe effectivement dans la gelée larvaire/gelée royale produite par les nourrices. Par conséquent, ces toxines végétales ne présentent pratiquement aucun risque pour les larves malgré leur potentielle sensibilité. Au cours de leur évolution, les abeilles se sont bien adaptées, puisqu'elles nourrissent leurs larves avec de la gelée larvaire.

Avantages de la production de gelée larvaire

Pour les insectes sociaux tels que les abeilles mellifères, la production de gelée larvaire offre des avantages importants. La gelée larvaire est plus digestible qu'une nourriture composée uniquement de pollen, comme c'est le cas pour les larves d'abeilles sauvages et de bourdons.

La gelée favorise en outre la croissance des larves et donc un développement plus rapide de la colonie. Elle a par ailleurs un effet antimicrobien, qui peut prévenir les infections. De plus, comme le montre cette étude, par la production de gelée larvaire, les nourrices protègent les larves contre les toxines contenues dans le pollen ^[1].

Protection contre les pesticides

Le pollen peut contenir non seulement des toxines naturelles, mais aussi des pesticides, susceptibles de contaminer le pollen, le pain d'abeilles et la gelée larvaire de la même manière que les toxines naturelles des plantes à fleurs et donc de nuire au développement des abeilles. Les méthodes présentées dans cet article pourraient également être appliquées pour l'évaluation des produits phytosanitaires. Il est important de pouvoir évaluer ce risque pour les abeilles afin de protéger leur santé.

*Ce travail est le fruit d'une collaboration entre le Centre de recherche apicole et Christophe Praz/Gaëtan Glauser de l'Université de Neuchâtel.
Le lien vers cette publication de même que de plus amples informations sur les AP dans les produits apicoles sont disponibles sur notre site www.apis.admin.ch Abeilles > Produits apicoles > Miel > Résidus dans le miel > Alcaloïdes pyrrolizidiniques.*

Références bibliographiques

- [1] Lucchetti, M. A., Kilchenmann, V., Glauser, G., Praz, C., & Kast, C. (2018). Nursing protects honeybee larvae from secondary metabolites of pollen. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1875), 20172849. (DOI: 10.1098/rspb.2017.2849).
- [2] Crailsheim, K. (1990). The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie*, 21(5), 417-429.
- [3] Babendreier, D., Kalberer, N., Romeis, J., Fluri, P., & Bilger, F. (2004). Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plant. *Apidologie*, 35, 293-300.
- [4] Kast, C., Dübecke, A., Kilchenmann, V., Bieri, K., Böhlen, M., Zoller, O., Beckh, G., & Lüllmann, C. (2014). Analysis of Swiss honeys for pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 75-83.
- [5] Kast, C., Kilchenmann, V., Reinhard, H., Droz, B., Lucchetti, M. A., Dübecke, A., Beckh, G., & Zoller, O. (2018). Chemical fingerprinting identifies *Echium vulgare*, *Eupatorium cannabinum* and *Senecio* spp. as plant species mainly responsible for pyrrolizidine alkaloids in bee-collected pollen. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(2), 316-327.
- [6] Lucchetti, M. A., Glauser, G., Kilchenmann, V., Dübecke, A., Beckh, G., Praz, C., & Kast, C. (2016). Pyrrolizidine alkaloids from *Echium vulgare* in honey originate primarily from floral nectar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(25), 5267-5273.
- [7] Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, 58(2), 107-111.
- [8] Reinhard, A., Janke, M., von der Ohe, W., Kempf, M., Theuring, C., Hartmann, T., Schreier, P., & Beuerle, T. (2009). Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of chemical ecology*, 35(9), 1086-1095.