

**Etude expérimentale de la toxicité de l'imidaclopride  
distribué dans le sirop de nourrisseurs à des colonies d'abeilles  
(*Apis mellifera*)**

FAUCON Jean-Paul, AURIERES Clément, DRAJNUDEL Patrick, RIBIERE Magali,  
MARTEL Anne-Claire, ZEGGANE Sarah, CHAUZAT Marie-Pierre  
et AUBERT Michel.

AFSSA, Laboratoire d'études et de recherches sur la pathologie des petits ruminants et des abeilles

Les Templiers, 105 route des Chappes, B.P. 111 – F-06902 Sophia-Antipolis Cedex.

version du 24 février 2004

## Table des matières

1. INTRODUCTION.....	3
2. MATERIELS ET METHODES.....	3
2.1. Protocole général.....	3
2.2. Rucher.....	3
2.3. Nourrissement expérimental.....	4
2.4. Activité et mortalité des abeilles.....	4
2.5. Poids des colonies et production de miel.....	5
2.6. Visites des colonies.....	5
2.7. Analyses chimiques.....	5
2.8. Pathologies.....	6
2.9. Météorologie et environnement.....	6
2.10. Analyses statistiques.....	7
3. RESULTATS.....	8
3.1. Collecte du sirop par les abeilles.....	8
3.2. Ponte.....	8
3.3. Activité.....	8
3.4. Transport du pollen.....	9
3.5. Population d'abeilles adultes.....	9
3.6. Couvain.....	10
3.7. Poids des ruches.....	11
3.8. Maladies et parasites.....	11
3.9. Mortalité.....	12
3.10. Notation des colonies après l'hiver.....	12
3.11. Analyses chimiques.....	13
4. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	13
4.1. Les résultats principaux de l'étude.....	13
4.2. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la discordance entre les résultats de cette étude et les rapports de nombreux apiculteurs.....	15
4.2.1. discussion sur la validité du protocole :.....	15
4.2.2. discussion sur la signification des résultats observés :.....	17
5. RESUME.....	19
BIBLIOGRAPHIE.....	20

## **1. INTRODUCTION**

Considérant que les résultats des tests de toxicité conduits sur l'abeille dans des conditions de laboratoire, en ruche ou en tunnel ne peuvent être directement transposés aux conditions communes d'élevage des colonies (Smirle *et al.* 1984), l'étude présentée ici visait à mieux définir les effets pathogènes potentiels de l'exposition d'abeilles à l'imidaclopride véhiculé par le nectar. Afin de mimer cette exposition, plusieurs colonies ont été nourries pendant un été de manière répétée avec du sirop contenant de l'imidaclopride à la concentration 0.5 ou 5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Ces concentrations ont été choisies pour couvrir l'intervalle des valeurs mesurées dans le nectar de tournesol ou de colza issu de graines enrobées par cet insecticide. En nous référant à l'étude bibliographique exhaustive de Doucet-Personeni *et al.* (Doucet-Personeni *et al.* 2003), les titres moyens de 1.9  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  donnés par Stork *et al.* (Stork 1999) pour le nectar de tournesol et l'intervalle de 0.5 – 0.85  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  pour le nectar de colza (Scott-Dupree & Spivak 2000) doivent être considérés comme valides. Ces colonies d'abeilles ont été suivies jusqu'au premier jour du printemps suivant, en parallèle avec des colonies témoins.

## **2. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Protocole général**

Plusieurs colonies d'abeilles domestiques ont été nourries pendant l'été avec du sirop de saccharose supplémenté à l'imidaclopride. Leur développement a été suivi en parallèle jusqu'à la fin de l'hiver suivant par des expérimentateurs qui n'étaient pas informés des traitements attribués aux différents lots de colonies d'abeilles. L'imidaclopride et l'un de ses dérivés, l'acide 6-chloronicotinique ont été recherchés sur des échantillons du sirop de nourrissage ainsi que dans les abeilles et le miel des différents lots. Les différentes étapes du protocole sont détaillées dans les paragraphes suivants et résumées par le tableau 1.

### **2.2. Rucher**

Les expériences ont été conduites sur 33 ruches Langstroth à 10 cadres équipées de nourrisseurs couvre-cadres. Ces colonies ont été sélectionnées dans le rucher expérimental du laboratoire et comptaient parmi les plus fortes. Les abeilles (*Apis mellifera mellifera*) étaient de race locale noire. Le 29 mai 2000, elles furent transférées sur des cadres de cire gaufrée. La cire de ces cadres provenait de trois lots achetés à la société Ickowicz (Bollène, Vaucluse, France) et a été soumise à des analyses multirésiduelles avant utilisation (voir plus loin). Réparties au hasard en quatre groupes de 8 ou 9, les ruches ont été placées ensemble sur le site dans le parc du laboratoire de l'AFSSA Sophia-Antipolis, Alpes-Maritimes, France. Pour limiter autant que faire se peut les risques de dérive, les différents groupes de ruches ont été placés à plus de 30 mètres les uns des autres et une orientation identique a été donnée à toutes les ruches d'un même groupe, chaque groupe étant orienté de manière différente sud, sud-sud-est, sud-est-est et est. Un tissu blanc a été étalé devant les ruches en vue de faciliter l'observation des abeilles malades ou mortes.

Une colonie supplémentaire a été ajoutée à chaque groupe pour rechercher les polluants de l'environnement contenu dans le pollen apporté à la ruche. Ces quatre ruches furent équipées de trappes à pollen. Cependant, elles ne furent ni transférées sur des cadres de cire gaufrée, ni visitées, ni nourries, au contraire des 33 autres ruches pour lesquelles le protocole décrit ci-dessous fut appliqué.

### 2.3. Nourrissement expérimental

Au mois de juillet, quand toutes les colonies furent bien établies, un des traitements suivants a été attribué par tirage au sort à chacun des groupes : pas de nourrissement durant l'expérience (groupe Gno), nourrissement par l'un des trois sirops de saccharose (50/50) suivants : sirop de saccharose seul (groupe G0), sirop de saccharose avec  $0.5 \mu\text{g.kg}^{-1}$  d'imidaclopride (groupe G0.5), sirop de saccharose avec  $5\mu\text{g.kg}^{-1}$  d'imidaclopride (groupe G5).

Le nourrissement a débuté le 12 juillet 2000. Un litre de sirop mesuré avec précision à l'aide d'une éprouvette graduée a été administré à chacune des colonies 3 fois par semaine jusqu'au 14 août, soit au total 13 distributions et un volume total de 13 l de sirop par colonie. Pour éviter tout pillage, les nourrisseurs étaient remplis de sirop le soir juste après le coucher du soleil. Dans la suite du texte, la période s'étalant du 12 juillet au 14 août 2000 sera désignée comme la période de nourrissement et les groupes G0, G0.5 et G5 seront désignés comme les groupes nourris.

L'imidaclopride sous forme de poudre provenait de la Société Cluzeau Info Labo (Sainte Foy la Grande, Gironde, France). A partir d'une solution initiale dans l'acétone ( $100 \text{ mg.l}^{-1}$ ), ont été préparées deux solutions mères d'imidaclopride dans l'acétone (titrant  $0.5$  et  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Ces solutions mères toujours conservées à  $4^\circ \text{C}$  ont été utilisées pour la préparation extemporanée de tous les sirops enrichis à l'imidaclopride. Ces sirops ont été obtenus en mélangeant pendant 5 heures à l'aide d'un agitateur magnétique 10 litres de la solution initiale de saccharose (saccharose et eau : 50/50 masse/volume) avec 10 ml de solution à  $0.5 \text{ mg.l}^{-1}$  (pour obtenir du sirop contenant  $0.5 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'imidaclopride) ou 10 ml de solution à  $5 \text{ mg.l}^{-1}$  (pour obtenir du sirop contenant  $5 \mu\text{g.l}^{-1}$  d'imidaclopride). Pour protéger l'imidaclopride de la lumière directe du soleil, tout le processus de préparation des sirops a été fait dans une pièce sombre et les fioles étaient enveloppées dans du papier d'aluminium. Pour le titrage de l'imidaclopride, les sirops alliquotés du premier nourrissement ont été congelés immédiatement après leur élaboration ou après 24 heures à température ambiante toujours à l'abri de la lumière directe du soleil.

A l'automne 2000, les colonies du groupe Gno apparurent trop faibles pour passer l'hiver correctement. Elles furent donc nourries de sucre candi (2.5 kg par colonie) le 22 septembre 2000.

### 2.4. Activité et mortalité des abeilles

Du 12 juillet au 18 décembre 2000, l'activité des abeilles a été évaluée en comptant le nombre d'abeilles entrant dans la colonie pendant une minute. L'opération de comptage a toujours commencé à 14 heures. Cette mesure a toujours été effectuée sur les colonies selon le même ordre afin de maintenir le même intervalle de temps entre les observations de ces colonies d'un jour à l'autre. La durée totale de l'opération de comptage pour l'ensemble des ruches n'a jamais excédé 45 minutes.

La présence ou l'absence de pollen rapporté par les butineuses a aussi été observée et codée « 1 » ou « 0 » respectivement.

Tous les symptômes observés sur les abeilles et l'aspect des abeilles mortes à l'entrée de la ruche ont été enregistrés. Les abeilles mortes devant les ruches ont été ramassées à l'aide d'un aspirateur portable. Du 13 juillet au 1<sup>er</sup> septembre 2000, le nombre d'abeilles mortes a été enregistré tous les jours sauf les samedi et dimanche. Les abeilles mortes ont été immédiatement comptées puis stockées à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'aux analyses multirésiduelles et au titrage de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique. A partir du 1<sup>er</sup> septembre 2000, seules les mortalités anormales ont été recherchées en inspectant 3 fois par semaine le linge blanc placé devant les ruches.

## 2.5. Poids des colonies et production de miel

Les colonies ont été pesées le matin tôt avant le départ des butineuses en utilisant une balance électronique (précision = +/- 0.05 kg). Depuis le début de l'expérimentation toutes les ruches ont été pesées en utilisant une hausse vide comme tare jusqu'à ce que les hausses soient ajoutées sur les corps. Les pesées ont été effectuées toutes les semaines du 12 juillet 2000 au 2 octobre 2000. A partir de cette date, la fréquence des pesées a diminué compte tenu de la baisse d'activité des colonies. La dernière pesée a été effectuée le 16 février 2001. Le miel (de hausse seulement) a été extrait le 17 août 2000. Un échantillon du mélange des miels de toutes les ruches de chaque lot a été réalisé et congelé pour doser l'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique. Après l'extraction du miel, aucune tare n'a été utilisée pour les pesées.

## 2.6. Visites des colonies

Les colonies ont été visitées les 11 et 24 juillet, les 7 et 21 août, le 4 septembre, le 25 octobre 2000 et le 21 mars 2001. Dans un premier temps, l'entrée de la ruche n'a été que légèrement enfumée pour ne pas déranger la grappe. La population des ruches a été évaluée en comptant le nombre d'inter-cadres occupés par les abeilles adultes juste après avoir retiré le nourrisseur couvre-cadres. Quand les ruches étaient munies de hausses, le nombre d'inter-cadres occupés était évalué à 11 plus le nombre d'inter-cadres occupés dans la hausse. La qualité du couvain, la présence d'œufs, de cellules royales et de symptômes spécifiques de maladies ont été notés. Au cours des six premières visites, les deux faces des cadres qui contenaient du couvain operculé ont été identifiées avec des étiquettes et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique. Une surface de référence (une punaise de couleur) a été plantée dans chaque cadre pour déterminer l'échelle. La surface de couvain operculé a été mesurée en utilisant le logiciel graphique Photoshop® sur ces photographies. La répétabilité de cette méthode avait été préalablement testée sur d'autres cadres (données non fournies ici).

Au cours de la dernière visite (le 21 mars 2001), les cadres de couvain (operculé ou non operculé) ont été comptés mais la surface de couvain operculé n'a pas été mesurée. A l'issue de cette dernière visite, l'un de nous, ignorant à quel traitement chacun des groupes avait été soumis, a évalué qualitativement la force des colonies comme l'aurait fait un apiculteur. Il a attribué à chaque colonie une note allant de 0 à 5 en intégrant l'évaluation de la population des abeilles adultes, le nombre de cadres de couvain, sa qualité (compact ou en mosaïque), la présence éventuelle de mycoses ou autres signes de maladie

## 2.7. Analyses chimiques

Des analyses multirésidus ont été effectuées au laboratoire de l'AFSSA Sophia Antipolis sur la cire gaufrée, les abeilles mortes des ruches en expérimentation et les pelotes de pollen des colonies supplémentaires. L'analyse multirésidus a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (Auto system XL, Perkin Elmer) en utilisant un détecteur à capture d'électrons pour les organochlorés et les pyréthriinoïdes de synthèse et en utilisant un détecteur à nitrogène de phosphore (NPD) pour les organophosphorés. Une liste des pesticides recherchés et leur limite de détermination est donnée dans le tableau 2.

Une analyse spécifique a été effectuée sur le sirop, les abeilles, les pelotes de pollen et le miel afin de quantifier l'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique. Ces titrages ont été réalisés dans un autre laboratoire (GIRPA, Angers, France) en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrographie de masse (GC/MS). Les limites de quantification (LQ) de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique étaient respectivement de 8 et 5 µg.kg<sup>-1</sup> et

les limites de détection (LD) ont été évaluées à 3 et 1  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . L'imidaclopride contenu dans le sirop a aussi été recherché par une analyse complémentaire en LC-MS/MS par l'AFSSA Maisons-Alfort (France) (LQ= 0.25  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  ; LD = 0.08  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ). A l'exception des deux échantillons de sirop envoyés à l'AFSSA Maisons-Alfort (sirop sans imidaclopride et sirop ayant un titre nominal d'imidaclopride de 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) et des pelotes de pollen, les échantillons envoyés pour titrage au GIRPA et à l'AFSSA Maisons-Alfort ont été codés.

## 2.8. Pathologies

Les pathologies étudiées ont été l'acariose, la nosérose, la varroase, la loque américaine, la loque européenne, la mycose, la paralysie chronique (agent causal : Chronic bee paralysis virus, CBPV). L'acariose et la nosérose ont été diagnostiquées selon les méthodes de l'OIE (OIE 2000a,OIE 2000d). Selon le nombre de spores observées dans le champ microscopique, la nosérose a été codée comme nulle (pas de spore), légère (1 à 9 spores), faible (de 10 à 49 spores), moyenne (50 à 100 spores), ou forte (plus de 100 spores). Le diagnostic clinique et la bactérioscopie ont été utilisés pour détecter les mycoses et les maladies du couvain (OIE 2000b,OIE 2000c). L'infection par le virus du couvain sacciforme (Sacbrood bee virus, SBV) a été diagnostiquée par immunodiffusion en gélose (IDG) (Giauffret 1974). L'infection inapparente d'abeilles adultes par le virus de la paralysie chronique a été détectée par RT-PCR alors que la forme symptomatique a été caractérisée par les deux réponses positives aux deux techniques IDG et RT-PCR (Ribière *et al.* 2000,Ribière *et al.* 2002). Les deux tests ont été systématiquement effectués sur des abeilles échantillonnées à l'intérieur de toutes les colonies le 11 juillet et le 25 octobre 2000 et sur des abeilles échantillonnées à l'entrée de toutes les ruches le 21 juillet 2000.

Lorsque des symptômes de paralysie chronique étaient suspectés pendant l'expérimentation, des abeilles adultes ont été échantillonnées pour analyse par IDG. Quand des abeilles malades ou mortes étaient trouvées sur le tissu blanc placé à la sortie des ruches, elles ont été considérées comme appartenant aux groupes de ruches correspondants, mais n'ont pu être rattachées à des ruches individuelles contrairement aux abeilles collectées à l'intérieur ou à l'entrée des ruches.

*Varroa destructor* (Acari : Varroidae) a été traité préventivement à l'aide de lanières Apivar® du 21 mars au 29 mai 2000. Après l'observation d'abeilles aux ailes atrophiées devant plusieurs ruches, le même traitement a été répété du 22 août au 6 novembre 2000. Des varroas ont été récoltés dans tous les groupes, tous les un, deux ou trois jours pendant une période de trois semaines après le 22 août. Du Périzin® a été appliqué le 7 novembre 2000 comme dernier traitement pré-hivernal.

Du Fumidil B®, un antibiotique qui disposait à cette époque d'une AMM pour le traitement de *Nosema apis* (Microsporidia) a été appliqué les 3, 9 et 22 janvier 2001.

Tous ces traitements ont été appliqués sur la totalité du rucher y compris les quatre ruches supplémentaires munies de trappes à pollen.

## 2.9. Météorologie et environnement

Les données sur la température, les précipitations et l'humidité relative ont été fournies par les stations météorologiques les plus proches situées à Valbonne et à l'aéroport de Nice. De mai à août 2000, les températures mensuelles moyennes ont été comprises entre 19,00 et 24,15°C et les précipitations ont été très rares (moyenne mensuelle : 2,2 mm). L'ensoleillement a été maximum pendant le mois de juillet (moyenne : 11,21 heures par jour). Les températures ont commencé à diminuer en septembre 2000 : la température moyenne la plus basse pendant cette période a été 9°C en janvier 2001. Les précipitations mensuelles moyennes ont été de



13,42 mm au plus (novembre 2000). Les températures moyennes et l'ensoleillement ont commencé à augmenter de nouveau en février 2001.

L'environnement proche du rucher était constitué de forêt (*Quercus suber* et *Q. ilex*) et de pelouse sèche de type méditerranéen. En conséquence, les principales sources de nourriture étaient le nectar, le pollen ou le miellat récoltés sur une grande variété de plantes sauvages dont la badasse (*Dorycnium pentaphyllum*), plusieurs sauges (*Salvia sp.*), le thym (*Thymus sp.*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), plusieurs bruyères (dont *Erica arborea*), des arbusiers (*Arbutus unedo*), *Inula viscosa*, *Solidago sp.*

## 2.10. Analyses statistiques

Les moyennes des variables continues dont la distribution a pu être considérée comme suivant la loi de Laplace-Gauss (surface du couvain operculé, poids des ruches), ont été comparées selon la méthode d'analyse de la variance à l'aide des modules appropriés du logiciel JMP<sup>®</sup> du SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA 27513). Cette analyse a été suivie d'une comparaison multiple des moyennes prises deux à deux selon le test de Tukey-Kramer (honestly significant difference test : (Kramer 1956) en utilisant ce même logiciel. Puisque ces mesures ont été relevées à des intervalles de temps différents sur les mêmes ruches, l'analyse a porté sur la variation de ces paramètres depuis le début de l'expérimentation.

Les indices d'activité (nombre d'abeilles entrant dans la ruche en 1 minute) ont été transformés en logarithme pour les normaliser avant d'être comparés selon le modèle multivarié avec mesures répétées inclus dans le logiciel JMP<sup>®</sup> déjà cité.

Dans la plupart des cas cependant, la nature des données n'autorise pas l'hypothèse de normalité (ni d'autres modèles simples), et impose d'utiliser des tests non paramétriques. Ces données ont donc été organisées en tableaux de contingence et interprétées à l'aide du logiciel StatXact<sup>®</sup> (C. Mehta and N. Patel, 2000, CYTEL Software Corporation, Cambridge, MA, USA 02139) qui offre un large choix de tests résolus à l'aide d'algorithmes puissants permettant la permutation de tous les tableaux de contingence qu'il est possible de construire à partir des données expérimentales observées. Selon la structure des données étudiées, les tests utilisés ont été les suivants :

- le test factoriel exact de Fisher (Agresti 1990). Ce test utilisable pour les tableaux de contingence 2x2, a été utilisé pour comparer au sein des mêmes groupes expérimentaux, la fréquence du transport de pollen vers la ruche pendant et après la période de nourrissage,
- le test d'indépendance du Chi 2 de Pearson (Agresti 1990) a été utilisé pour comparer entre les groupes la fréquence de paramètres sans notion d'intensité : essaimage, présence/absence d'une maladie donnée,
- le test de Kruskal-Wallis (Siegel & Castellan 1988). Conçu pour interpréter des tableaux dans lesquels les réponses (mais non les traitements) peuvent être classées dans un ordre d'intensité, ce test a été utilisé lorsque l'on a comparé entre tous les groupes, le nombre de jours au cours desquels des abeilles ont été observées transportant du pollen vers la ruche, le nombre d'inter-cadres occupés par des abeilles adultes, le nombre de cadres de couvain operculé et les notes finales attribuées aux colonies au début du printemps 2001,
- le test de Jonckheere-Terpstra (Lehmann 1975). Conçu pour l'interprétation des tableaux doublement ordonnés, ce test a été utilisé lorsque l'on a cherché à vérifier si dans les groupes nourris avec du sirop de plus en plus concentré en imidaclopride (de 0 à 5  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ), l'effet observé était significativement plus fréquent (ou moins fréquent). On a donc comparé les mêmes données qu'avec le test précédent mais cette fois, uniquement pour les groupes nourris et lorsque l'effet a été mesuré pendant ou après le nourrissage (et non avant celui-ci),
- le test de Cochran-Armitage (Cochran 1954) vise à évaluer la probabilité que les taux de réponse de deux distributions binomiales suivent une tendance. Ce test a été utilisé pour

vérifier si les colonies traitées au sirop supplémenté à l'imidaclopride étaient devenues plus (ou moins) susceptibles de développer la paralysie chronique.

Pour tous les tests, on a donné la valeur précise du risque de rejet de l'hypothèse nulle et pour homogénéiser la nomenclature nous avons utilisé le même symbole ( $\alpha$ ). Selon l'usage habituel, nous avons considéré comme significatif tout seuil de significativité inférieur ou égal à 0,05.

### **3. RESULTATS**

#### **3.1. Collecte du sirop par les abeilles**

Le lendemain de chaque nourrissage, le rucher a été inspecté et l'on a pu vérifier l'absence de pillage qui aurait alors pu indiquer quelque anomalie au niveau de nourrisseurs. Quelques nourrisseurs ont également été directement examinés et l'on a alors pu observer les abeilles venant chercher le sirop. A chaque remplissage des nourrisseurs, nous avons toujours constaté que ceux-ci avaient été vidés dans l'intervalle et que quelques abeilles continuaient de les visiter.

Ces observations sont cohérentes avec le fait que les groupes de ruches nourries ont augmenté davantage leur poids que le groupe non nourri et que le gain de poids moyen enregistré par les premières fut identique que le sirop fut supplémenté ou non en imidaclopride (voir paragraphe "poids des ruches").

#### **3.2. Ponte**

Le 11 juillet (c'est-à-dire le jour précédent le premier nourrissage expérimental), une reine du groupe Gno a été tuée accidentellement. Une autre ruche du même groupe et deux ruches du groupe G0.5 ont été trouvées sans œuf, conséquence probable d'essaimage qui n'ont pas été observés. Au cours des deux visites qui suivirent et qui se sont déroulées pendant la période de nourrissage, aucun œuf n'a été trouvé dans la première ruche (logiquement), mais des œufs ont été observés dans les trois autres ruches pré-citées. Cependant, nous avons observé qu'une autre colonie du groupe Gno et trois colonies du groupe G0 avaient essaimé. Après la période de nourrissage, une autre colonie du groupe Gno a été trouvée sans œuf de manière transitoire et une des colonies pré-citée du groupe G0.5 a essaimé en septembre. Après l'hivernage (21 mars 2001), toutes les colonies de tous les groupes étaient en ponte alors qu'une reine d'une colonie du groupe G0 était devenue bourdonneuse.

En résumé, pendant et après la période de nourrissage, le nombre de colonies qui ont probablement ou assurément essaimé a été de 2, 2, 1 et 0 dans les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans cette fréquence entre les groupes (Chi 2 calculé = 2.6 avec 3 degrés de liberté (ddl) :  $\alpha = 0.72$ ).

#### **3.3. Activité**

L'évolution au cours de l'étude des indices moyens d'activité par groupe est résumée par la figure 1a.

Au début de l'expérimentation, l'indice d'activité des colonies a été compris entre 5 à 55 abeilles entrant dans la ruche par minute (moyenne = 27 abeilles par minute), sans aucune différence statistiquement significative entre les groupes (F=2.16 avec 3 et 29 dl :  $\alpha = 0.11$ ). Cet indice a diminué dans tous les groupes atteignant une moyenne de 20 abeilles par minute à la fin du nourrissage (c'est-à-dire 34 jours plus tard). A cette période, les indices d'activité moyenne par groupe étaient significativement hétérogènes (F=2.94 avec 3 et 29 ddl



au niveau 0.05). L'étude de la période de nourrissage dans son ensemble, en utilisant un modèle multivarié sur des mesures répétées a confirmé :

a/ une diminution significative générale de l'indice d'activité pour tous les groupes (effet temps :  $F=9,8$  avec 20 et 10 ddl :  $\alpha = 0.0004$ ),

b/ des indices d'activité plus élevés dans les groupes G5 et G0.5 comparés aux groupes G0 (effet groupe :  $F= 4.35$  avec 2 et 22 ddl :  $\alpha = 0.026$ ) et Gno (effet groupe :  $F=2.89$  avec 2 ddl  $\alpha = 0.052$ ). Aucune différence n'était significative entre les groupes G0 et Gno (effet groupe :  $F= 1.1$  avec 1 et 15 ddl :  $\alpha = 0.32$ ).

Après la période de nourrissage, l'indice d'activité a évolué pour tous les groupes de manière simultanée : augmentation rapide à la mi-août, puis une diminution jusqu'à un minimum en septembre et une nouvelle augmentation à la fin septembre. La tendance générale de cette période est une diminution : à la fin de l'expérimentation (début décembre), aucune différence entre les groupes n'a été observée : l'indice moyen était de 11.5 abeilles par minute. L'utilisation d'un modèle multivarié sur des mesures répétées pour étudier la tendance générale durant la période post-nourrissage a confirmé:

a/ la persistance de la diminution de l'indice d'activité pour tous les groupes (effet temps :  $F = 9.47$  avec 11 et 19 ddl :  $\alpha < 0.0001$ ),

b/ l'absence de différence significative dans l'indice d'activité entre les groupes (effet groupe :  $F_{G0/G0.5/G5} = 0.8$  avec 2 et 22 ddl :  $\alpha = 0.46$  ;  $F_{G0/Gno} = 0.04$  avec 1 et 15 ddl  $\alpha = 0.84$ ).

### 3.4. Transport du pollen

Pendant la période de nourrissage, le nombre de jours pendant lesquels des abeilles ont été observées avec des pelotes de pollen a varié entre 5 et 21 selon la ruche (moyenne : 15.5 jours sur 21 jours d'observation avec une moyenne de 14.0, 14.3, 16.0 et 18.0 jours pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement (figure 2). Quand on considère tous les groupes, les différences n'apparaissent pas significatives (test de Kruskal-Wallis :  $\alpha = 0.10$ ). Cependant quand on considère les groupes nourris au sirop et à condition d'utiliser un test statistique plus approprié, on constate que plus la concentration d'imidaclopride était élevée dans le sirop, plus fréquents étaient les jours où l'on a observé des abeilles avec des pelotes de pollen (test de Jonckheere-Terpstra :  $\alpha = 0.003$ ).

Après la période de nourrissage, le nombre de jours où les abeilles ont été observées avec des pelotes de pollen a varié entre 8 et 12 selon la ruche (moyenne : 10.7 jours sur 12 jours d'observation) avec une moyenne de 10.0, 10.8, 10.8 et 11,4 jours pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Ces différences ne sont pas significatives (pour tous les groupes test de Kruskal-Wallis :  $\alpha = 0.11$  ; pour les groupes nourris au sirop : test de Jonckheere-Terpstra :  $\alpha = 0.24$ ).

De la première à la seconde période, la fréquence du transport de pollen a augmenté significativement dans tous les groupes : de 67 à 87 %, de 68 à 90 %, de 76 à 90% et de 86 à 95 % pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement (le test de Fisher donne les seuils de significativité suivants : 0.00, 0.00, 0.01 et 0.02 respectivement).

### 3.5. Population d'abeilles adultes

L'évolution au cours de l'étude du nombre d'inter-cadres occupés par les abeilles adultes est résumée par la figure 3.

Au début de l'expérimentation, les ruches avaient 6 à 11 inter-cadres occupés (moyenne = 9.8 sans aucune différence significative entre les groupes (test de Kruskal-Wallis :  $\alpha = 0.18$ ). Jusqu'au mois d'août la population d'abeilles adultes a augmenté jusqu'à un nombre moyen de 11.8 inter-cadres occupés puis, cette population a diminué jusqu'à une valeur de 9.5 inter-cadres occupés à la fin du mois d'octobre 2000. Du début de l'expérience jusqu'à la fin du

mois d'octobre, la variation moyenne d'inter-cadres occupés a été +0.6, +1.6, +2.5 et +3.4 pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Que l'on considère la période qui sépare le début de l'expérience à août, ou à la fin octobre, aucune différence entre les groupes n'est statistiquement significative (comparaisons entre tous les groupes : test de Kruskal-Wallis :  $\alpha > 0.23$  et  $0.87$  respectivement pour les deux périodes ; seulement pour les groupes nourris au sirop : test de Jonckheere-Terpstra :  $\alpha = 0.09$  et  $0.35$ ).

Après l'hivernage (21 mars 2001), le nombre moyen d'inter-cadres occupés était de 8.9 sans différence entre les groupes (comparaison entre tous les groupes test de Kruskal-Wallis :  $\alpha > 0.69$ ; seulement pour les groupes nourris : test de Jonckheere-Terpstra :  $\alpha = 0.41$ ).

Ceci est cohérent avec le fait que les variations observées du début de l'expérimentation au printemps suivant (égales à -0.75, -1.1, +0.125 et -1.75 pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement) ne sont pas statistiquement différentes (comparaisons entre tous les groupes test de Kruskal-Wallis :  $\alpha > 0.62$  ; seulement pour les groupes nourris : test de Jonckheere-Terpstra :  $\alpha = 0.29$ ).

L'ensemble des résultats des tests statistiques appliqués à ce paramètre est résumé par le tableau 3.

### 3.6. Couvain

L'évolution au cours de l'étude de la surface moyenne par groupe du couvain operculé est résumée par la figure 1b.

Au début de l'expérimentation la surface moyenne était de 38.0, 32.1, 32.5 et 34.1 dm<sup>2</sup> pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement sans différence significative entre les groupes ( $F=0.37$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.78$ ). Pendant la période de nourrissage, la surface moyenne de couvain operculé a diminué de 28.1, 19.0, 11.9 et 19.4 dm<sup>2</sup> (jour 27), puis 21 jours après la fin de la période du nourrissage (jour 55), ces moyennes ont encore diminué de 4.3, 4.7, 11.3 et 5.9 dm<sup>2</sup> pour les mêmes groupes respectivement. Après chacune de ces périodes, ces variations n'ont jamais été significativement différentes entre groupes ( $F = 1.66$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.20$  et  $F = 1.52$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.23$  respectivement). Les mêmes tests réalisés aux périodes intermédiaires (jour 13 et jour 41) amènent également à conclure à l'absence de différences entre les groupes. Cependant, entre juillet et octobre (c'est-à-dire du jour 0 au jour 106), la diminution moyenne globale de la surface de couvain operculé est devenue statistiquement différente entre les groupes : 2.8, 8.7, 16.9 et 11.9 dm<sup>2</sup> ( $F = 5.21$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.005$ ). Le test de Tukey-Kramer permet de dire que le groupe Gno a eu la plus faible des diminutions de surface de couvain operculé et le groupe G0.5 la plus importante, cependant ce test ne permet pas de départager les groupes G0 et G5 des précédents.

On observe une diminution globale de la surface du couvain au cours de la saison entière : de 10.5 à 79.8 dm<sup>2</sup> en juillet 2000 (moyenne = 34.1 dm<sup>2</sup>) la surface a diminué jusqu'à atteindre la fourchette de 0 à 19.8 dm<sup>2</sup> à la fin octobre (moyenne = 4.5 dm<sup>2</sup>).

Après l'hivernage (21 mars 2001), le nombre de cadres portant du couvain était compris entre 3 et 9 avec les valeurs moyennes suivantes : 6.6, 7.0, 8.0 et 4.6 Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Alors que le test de Kruskal-Wallis ne confirme pas de différence significative quand tous les groupes sont pris en compte ( $\alpha = 0.33$ ), le test de Jonckheere-Terpstra nous permet de conclure à une hétérogénéité significative entre les groupes nourris au sirop ( $\alpha = 0.02$ ), avec plus de cadres portant du couvain dans le groupe G0.5 et moins dans le groupe G5 que dans le groupe G0 ( $\alpha = 0.03$  et  $\alpha = 0.004$  respectivement).

### 3.7. Poids des ruches

L'évolution au cours de l'étude du poids moyen de ruches par groupe est résumée par la figure 1c.

Au début de l'expérimentation le poids moyen était de : 37.3, 37.1, 41.6 et 40.2 kg pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement sans différence significative entre ceux-ci ( $F = 2.53$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.08$ ). Le poids de toutes les ruches a augmenté de façon régulière du 12 juillet au 16 août 2000, date de récolte du miel. Pendant cet intervalle, l'augmentation individuelle du poids des ruches a été comprise entre 2.45 et 22.8 kg (moyenne : 11.38 kg). L'augmentation moyenne a été de 6.89, 10.31, 15.21 et 13.25 kg pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. L'hétérogénéité entre tous les groupes est statistiquement significative ( $F = 5.32$  avec 3 et 24 ddl :  $\alpha = 0.006$ ), mais en comparant seulement les groupes nourris au sirop, il n'y a plus d'hétérogénéité statistiquement significative entre ceux-ci ( $F = 0.97$  avec 2 et 18 ddl :  $\alpha = 0.40$ ).

Comme logiquement les colonies les plus lourdes s'assurent le plus fort gain de poids (la corrélation est significative : augmentation de poids =  $0.45 \times$  poids initial - 6.2 ;  $F = 6.3$  avec 1 et 31 ddl :  $\alpha = 0.02$ ), il importait de vérifier l'absence d'interaction significative entre le poids initial et le groupe dans les deux précédentes analyses. Ceci est effectivement le cas :  $F = 0.076$  avec 3 et 24 ddl :  $\alpha = 0.97$  ; et  $F = 0.0067$  avec 2 et 18 ddl :  $\alpha = 0.94$ . En d'autres termes, les ruches ont été distribuées au hasard dans les différents groupes selon leur poids initial et l'hétérogénéité finale du gain de poids moyen entre les groupes n'est pas imputable à un quelconque défaut de randomisation des ruches en fonction de leur poids initial.

Le 16 août, le poids des hausses était compris entre 7.6 et 23.6 kg (moyenne = 12.1 kg). Le poids moyen d'une hausse a été de 8.7, 10.9, 16.1 et 12.8 kg dans les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement<sup>1</sup>. L'hétérogénéité entre les quatre groupes est statistiquement significative ( $F = 3.59$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.025$ ), alors qu'il n'y a pas d'hétérogénéité statistiquement significative entre les groupes nourris au sirop ( $F = 2.12$  avec 2 et 22 ddl :  $\alpha = 0.14$ ).

A partir du 16 août 2000, le poids des ruches n'a que faiblement diminué jusqu'au 20 octobre (-0.67 kg en moyenne), ce qui n'exclut pas des différences marquées entre ruches (données extrêmes : -4.4 et +3.2 kg). A partir de fin octobre, la diminution de poids est plus marquée, si bien qu'entre le 16 août 2000 et le 2 février 2001, la variation de poids des ruches a été en moyenne de -5.33 kg (valeurs extrêmes : -10.45 et -0.55 kg). Cette diminution globale est très significative ( $F = 5.5$  avec 11 et 14 ddl :  $\alpha < 0.02$ ). Mais la variation moyenne par groupe qui a été de -3.96, -6.61, -4.63 et -6.14 kg pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement, ne présente pas de différence statistiquement significative entre groupes ( $F = 2.98$  avec 3 et 24 ddl :  $\alpha = 0.052$ ).

### 3.8. Maladies et parasites

Le niveau d'infestation par *Nosema apis* avant et après la période de nourrissage est décrit par la figure 4. Au début de l'expérience, les niveaux de contamination n'étaient pas répartis de manière égale entre les groupes (test de Kruskal-Wallis  $\alpha = 0.04$ ). En fait, mis à part le groupe Gno (dont toutes les colonies étaient exemptes de *Nosema*), les niveaux de contamination n'étaient pas différents dans les autres groupes (test de Kruskal-Wallis

<sup>1</sup> En admettant que le poids moyen d'une hausse équipée de cadres et de cires gaufrée était de 7.5 kg, le poids du miel et de la cire produits a été compris entre 0.1 et 16.1 kg approximativement (moyenne = 4.6 kg).

$\alpha = 0.62$ ). Après la période de nourrissage, quatre colonies du groupe Gno ont été trouvées contaminées. Parmi les groupes des ruches nourries au sirop, les colonies du groupe G0.5 ont été les ruches les moins souvent et les moins sévèrement contaminées (test de Kruskal-Wallis  $\alpha = 0.04$ ).

Le diagnostic par RT-PCR spécifique du CBPV a démontré qu'au début de l'expérimentation, le virus était latent dans 8 (toutes), 4, 4 et 5 colonies des groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement (chi 2 calculé = 6.7 avec 3 ddl :  $\alpha = 0.10$ ). L'ensemble des résultats de ces tests ainsi que ceux pratiqués le 25 octobre (c'est-à-dire quatre mois après la période de nourrissage) est résumé dans par le tableau 4. Lors de cette seconde série de tests, une colonie du groupe Gno est apparemment devenue indemne de CBPV. Parmi les groupes nourris au sirop, ce phénomène s'est produit pour une et deux colonies des groupes G0.5 et G5 respectivement, alors que 5, 3 et 1 colonies qui étaient diagnostiquées par RT-PCR négatives au jour 0, ont été trouvées positives le 25 octobre (groupes G0, G0.5 et G5 respectivement). Cette tendance apparente (c'est-à-dire les colonies nourries au sirop avec des concentrations fortes d'imidaclopride seraient moins sujettes à devenir infectées par le CBPV de façon latente) n'est pas statistiquement significative (test de Cochran–Armitage :  $\alpha = 0.35$ ). Pendant la période d'observation, des symptômes de paralysie chronique (abeilles mortes ou tremblantes sur le linge blanc ou à l'entrée des ruches) ont été observés dans tous les groupes et leur étiologie a été confirmée par IDG.

En dépit du traitement Apivar® au printemps, les symptômes typiques d'infestation de varroa (abeilles avec les ailes atrophiées) ont été observés devant les colonies des groupes G0 et G5 après cette période. Le nombre total de varroa récoltés après la période de nourrissage a été compris entre 3 et 1244 par colonie avec une moyenne géométrique de 51.4 (figure 5). Aucune différence entre les groupes n'est significative ( $F = 1.64$  avec 3 et 29 ddl :  $\alpha = 0.20$ ).

### 3.9. Mortalité

La mortalité est resté très faible durant toute la durée de l'expérience. La mortalité la plus élevée a été constatée le 20 juillet avec 38 abeilles mortes par colonie dans le groupe G5. Le nombre total d'abeilles mortes collectées devant les ruches s'est élevé à 791, 1268, 1101 et 855 durant la période de nourrissage, puis 137, 231, 229 et 31 durant les 16 jours qui suivirent pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Pour ces mêmes groupes et les mêmes périodes, ces nombres correspondent respectivement à une moyenne journalière de 3.1, 4.4, 4.3 et 3.3 puis 1.1, 1.6, 1.8 et 0.2 abeilles trouvées mortes par colonie. Ces mortalités étant très faibles aucune analyse statistique n'est requise.

En décembre, des abeilles mortes ou affectées de symptômes typiques de la nosérose (abeilles "traînantes", marchant sur le sol, mais non diarrhéiques) ont été observées d'abord dans le groupe G0 puis après moins d'une semaine dans les autres groupes. Cela a nécessité l'application d'un traitement spécifique dès le mois de janvier (voir matériels et méthodes). Du 2 septembre au printemps suivant, aucune mortalité anormale n'a été observée dans les colonies.

### 3.10. Notation des colonies après l'hiver

Les notes individuelles par colonies ont variés de 2 à 5 (moyenne générale = 3.6), avec des moyennes de 3.6, 3.6, 4.4 et 2.9 pour les groupes Gno, G0, G0.5 et G5 respectivement. Ces moyennes ne sont pas statistiquement différentes (comparaisons entre tous les groupes test de Kruskal-Wallis :  $\alpha = 0.06$  ; seulement pour les groupes nourris : test Jonckheere-Terspstra :  $\alpha = 0.11$ ).

### 3.11. Analyses chimiques

Les analyses de la cire gaufrée ont révélé la présence de tau-fluvalinate dans chacun des trois lots analysés (0.141, 0.431 et 2.005 mg.kg<sup>-1</sup>), ainsi que du soufre dans deux (0.756 et 1.126 mg.kg<sup>-1</sup>).

Les analyses multirésiduelles pratiquées sur les pelotes de pollen des ruches témoins et les abeilles de tous les groupes n'ont révélé aucuns des toxiques cités dans le tableau 2.

Les résultats des dosages de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique dans les sirops, les abeilles et le miel sont résumés par le tableau 5.

Le dosage par l'AFSSA Maisons-Alfort de l'imidaclopride dans le sirop donné au groupe G5 (congelé immédiatement après préparation) a donné un titre de 4.65 µg.kg<sup>-1</sup>, valeur très proche de celle que l'on attendait (5 µg.kg<sup>-1</sup>). La quantification de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique dans le sirop administré au groupe G5 confirme la présence des deux produits dans l'échantillon congelé immédiatement après préparation de même que dans l'échantillon gardé 24 heures à température ambiante. Les résultats obtenus sur le sirop administré aux groupes G0.5 et G0 ont été inférieurs à la LD. La présence d'imidaclopride et d'acide 6-chloronicotinique a été détectée par le GIRPA dans les abeilles du groupe G0.5 mais n'a pas été confirmée sur les abeilles des autres groupes (Gno, G0, et G5). Ces deux produits ont été retrouvés dans le miel récolté dans les ruches du groupe G5, mais pas dans le miel des autres groupes (Gno, G0 et G0.5). Les résultats obtenus indépendamment sur les miels par l'autre laboratoire confirme la présence d'imidaclopride dans le miel récolté dans le groupe G5 avec un titre de 2.95 µg.kg<sup>-1</sup>. Les dosages de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique dans les pelotes de pollen ont fournis des chiffres inférieurs à la LD.

## 4. DISCUSSION ET CONCLUSION

### 4.1. Les résultats principaux de l'étude

a) *Avant le nourrissage*, les groupes de colonies ne présentaient aucune différence statistiquement significative quant au poids des ruches, au nombre d'abeilles adultes (population totale), à leur activité, à la fréquence des jours avec apport de pollen vers la ruche, à la surface du couvain operculé et à leur état sanitaire général.

b) *Pendant la période de nourrissage*, la totalité du sirop apporté dans les nourrisseurs a été enlevée par les abeilles. Ceci a été constaté par observation directe et est confirmé par la différence de gain de poids très significative entre les ruches nourries et les ruches du groupe Gno (non nourri). Le gain de poids moyen a été le même pour tous les groupes nourris, que le sirop fourni ait été ou non supplémenté à l'imidaclopride et quelle que fut la concentration de ce produit. Immédiatement après la période de nourrissage, le poids des ruches des groupes nourris avait augmenté en moyenne de 5,93 kg de plus que les ruches du groupe non nourri. Si l'on considère que cette différence est le résultat de l'apport de 13 litres soit 15,98 kg de sirop de sucre par colonie, nous devons conclure que pendant la période de nourrissage, le sirop a été en grande partie stocké par les abeilles (et concentré 2,7 fois) mais probablement également en partie consommé par celles-ci.

L'imidaclopride peut influencer négativement le comportement de prise alimentaire de plusieurs espèces d'insectes : la mouche des fruits *Rhagoletis pomonella* (Hu & Prokopy 1998), le termite *Reticulitermes flavipes* (Ramakrishnan et al. 2000) et les pucerons *Mysus persicae* et *Aphis gossypii* (Nauen et al. 1998). Dans notre étude, aucune des deux concentrations utilisées n'a induit un tel effet alors que l'on sait que des concentrations plus élevées dans le sirop de saccharose (500 et 1000 µg.kg<sup>-1</sup>) ont un effet répulsif sur l'abeille (Bortolotti *et al.* 2003).



Contrairement à ce que l'on attendait, aucune mortalité anormale n'a été observée dans les colonies nourries avec du sirop supplémenté à l'imidaclopride, pas plus d'ailleurs que dans les autres colonies.

Pendant les périodes de nourrissage, les seuls paramètres significativement différents, entre les groupes nourris avec du sirop de saccharose supplémenté à l'imidaclopride et les groupes nourris au sirop non supplémenté ont été chez les premiers :

- un indice d'activité des abeilles adultes plus élevé,
- une plus grande fréquence de l'apport de pollen à la ruche.

(L'accroissement observé du nombre d'abeilles adultes n'est pas statistiquement significatif).

*c/ Après la période de nourrissage et jusqu'à la fin de l'hiver*, ces différences ne sont plus observées. Les effectifs d'abeilles adultes et le poids des ruches restent homogènes entre les groupes nourris. Les seules différences observées concernent la surface du couvain operculé : le nombre de cellules operculées a décliné moins rapidement dans le groupe nourri avec le sirop contenant la concentration d'imidaclopride la plus faible ( $0,5 \mu\text{g. l}^{-1}$ ) que dans le groupe nourri au sirop non supplémenté (conséquence d'une poursuite d'une ponte plus intense chez les reines du groupe G0.5). Ce phénomène n'est cependant pas observé dans le groupe nourri avec le sirop contenant la plus forte concentration d'imidaclopride ( $5 \mu\text{g. l}^{-1}$ ).

*d/ Pendant l'été, l'automne et l'hiver*, à l'exception de la nosérose qui a frappé tous les groupes au début de l'hiver, aucune maladie n'a eu d'impact significatif sur les colonies et la mortalité a été apparemment très faible dans tous les groupes, sans que l'on puisse faire état de différence entre les groupes expérimentaux concernant ces paramètres.

*e/ A la fin de l'hiver*, des œufs étaient présents dans toutes les ruches ; toutes les ruches étaient de poids comparable et contenaient une population d'abeilles adultes suffisante et d'effectif comparable.

Tous les groupes de colonies ont obtenu des notes similaires appréciant leur force et leur santé. Un peu plus de cadres avec du couvain ont été observés dans le groupe de colonies nourries avec du sirop contenant  $0,5 \mu\text{g}$  d'imidaclopride par litre que dans les colonies nourries avec du sirop non supplémenté et ces dernières avaient elles-mêmes davantage de cadres avec du couvain que les colonies nourries avec le sirop le plus concentré en imidaclopride. Cependant, ces différences restent faibles et comme elles ne corrélaient pas avec la concentration de ce produit, elles pourraient être imputables à d'autres facteurs.

En résumé, les seules différences significatives entre groupes expérimentaux ont été une augmentation faible et transitoire de l'activité dans les colonies nourries au sirop supplémenté à l'imidaclopride et quelques différences dans le nombre de cellules de couvain. Cette augmentation d'activité peut correspondre au premier symptôme d'une intoxication par un composé neurotoxique. Ceci peut cadrer avec le fait que lorsque l'imidaclopride a cessé d'être administré, l'activité s'est rétablie au même niveau dans toutes les ruches. Concernant le second point, l'impact de l'imidaclopride sur la fécondité des insectes n'a été que peu étudié. L'imidaclopride altère la fécondité des femelles dominantes de *Bombus terrestris* (Tasei *et al.* 2000), alors que des doses sublétales de ce produit accroissent la ponte de *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) (James & Price 2002). La décroissance plus lente du nombre de cellules de couvain operculé observée dans le groupe des colonies nourries avec du sirop à  $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$  d'imidaclopride pourrait correspondre au même phénomène. Cependant, le bilan de ces différences sur la survie des colonies apparaît en définitive peu significatif.

Cette étude n'a démontré aucune interférence entre l'exposition des abeilles à l'imidaclopride et la fréquence des maladies. Or l'on sait que la toxicité de certains composés est susceptible



de diminuer la capacité de défense de l'abeille contre certains organismes pathogènes. D'autre part, Morse (Morse 1997) indique que dans les quatre à huit semaines qui suivent les pertes dues à une intoxication par des pesticides, les colonies souffrent fréquemment d'épisodes de loque européenne, de couvain sacciforme ou de couvain refroidi. L'imidaclopride augmente la susceptibilité de *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) (Ramakrishnan *et al.* 2000) et de *Blatella germanica* (Dictyoptera: Blatellidae) (Kaakeh *et al.* 1997) au champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. Quintela et McCoy (Quintela & McCoy 1997) ont démontré la synergie de l'imidaclopride à doses sub-létales et de *M. anisopliae* and *Beauveria bassiana* sur *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). Inversement, il n'est pas démontré que l'imidaclopride puisse interférer avec le virus polyédrique d'*Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Koppenhöfer & Kaya 2000).

D'une manière générale, tous les paramètres suivis dans cette expérimentation (activité, population des abeilles adultes, poids des ruches, couvain operculé) ont subi les variations saisonnières attendues dans le cours normal de la vie d'un rucher. Pendant et à la suite de l'exposition au sirop supplémenté à l'imidaclopride, aucune colonie n'a apparemment subi de problèmes, ni même de baisse de production de miel de manière immédiate ou différée.

L'administration répétée à plusieurs colonies d'abeilles de sirop supplémenté à l'imidaclopride n'a provoqué aucun des symptômes sévères attribués par plusieurs apiculteurs à l'usage de l'imidaclopride pour l'enrobage des semences des cultures avoisinantes : ces symptômes non observés étant une mortalité lors des premiers jours de l'absorption de sirop, et une mortalité différée avant, pendant ou à la fin de l'hiver qui suit cette absorption.

#### **4.2. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la discordance entre les résultats de cette étude et les rapports de nombreux apiculteurs.**

Cette discordance pourrait être imputable soit à un protocole défectueux, soit à des conditions expérimentales trop différentes de celles qui prévalent dans les régions où les apiculteurs attribuent les troubles observés à l'usage de l'imidaclopride.

##### **4.2.1. discussion sur la validité du protocole :**

*a/ Peut-on attester la présence d'imidaclopride dans les sirops distribués censés en contenir ?*

Ce produit a bien été retrouvé dans le sirop au titre nominal de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  – et cela par deux laboratoires indépendamment l'un de l'autre (l'un de ces laboratoires n'ayant eu à titrer que des échantillons positifs et négatifs codés). De plus, un des produits de dégradation de l'imidaclopride, l'acide 6-chloronicotinique, a été retrouvé dans ce sirop. L'imidaclopride et l'acide 6-chloronicotinique ont été également retrouvés dans un échantillon de ce sirop après qu'il ait été laissé 24 heures à température ambiante. Ces deux produits ont aussi été retrouvés dans le miel des colonies nourries avec le sirop le plus concentré ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Puisqu'au GIRPA la limite de détection de l'imidaclopride était supérieure au titre nominal de  $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , il est logique que ce laboratoire ne puisse confirmer la présence de cet insecticide dans le sirop le moins concentré. Cependant des traces d'imidaclopride et d'acide 6-chloronicotinique ont été retrouvées dans les abeilles mortes récoltées devant les colonies nourries avec celui-ci. Bien entendu, en se plaçant dans le pire scénario, on pourrait objecter que ces abeilles auraient pu avoir dérivé à partir des colonies nourries avec le sirop le plus concentré. Quoi qu'il en soit, il est peu concevable qu'une erreur de manipulation ait pu

aboutir à priver d'imidaclopride le sirop distribué au groupe G0.5: cette erreur aurait du être répétée 13 fois et pour ce sirop seulement, alors que c'est la même personne qui a préparé les deux sirops chargés en imidaclopride selon des protocoles parallèles.

*b/ Le nombre de ruches était-il suffisant pour permettre la mise en évidence de différences significatives entre les paramètres mesurés dans les différents groupes ?*

Les groupes étaient constitués de huit à neuf ruches. Ces nombres sont supérieurs au minimum recommandé par l'EPPO pour l'évaluation des effets indésirables des insecticides sur l'abeille (Oomen *et al.* 1992).

A cet argument normatif, s'ajoute un argument plus conséquent : les symptômes que l'on recherchait (ceux décrits par les apiculteurs) correspondant à des intoxications spectaculaires et sévères, le nombre de ruches utilisées aurait donc été largement suffisant pour que ces symptômes soient observables.

*c) Le sirop distribué dans les nourrisseurs a-t-il été consommé par les abeilles ?*

En été, la ruche ne contient plus de miel produit au cours de la saison précédente. Le nectar et le miel stockés à cette période provient de la récolte de l'année. Comme cela est observé pour les produits médicamenteux distribués aux abeilles par l'intermédiaire de sirop l'imidaclopride distribué sous forme de sirop n'est pas seulement stocké au niveau du corps de la ruche. C'est ce que démontre le résultat du dosage effectué sur le miel de hausse du groupe G5.

Il est donc certain que dès le nourrissage, toutes les abeilles des ruches nourries avec du sirop supplémenté en imidaclopride ont eu accès à ce produit. C'est en particulier le cas des abeilles d'intérieur qui assurent la thermorégulation de la ruche, activité coûteuse en énergie. Ces abeilles ont consommé en été (pour refroidir la ruche) et en hiver (pour la réchauffer), du nectar et le miel constitué en partie à partir du sirop.

Le sirop de nourrissage étant aussi stocké dans le corps de ruche, nous n'avons pas récolté celui-ci afin de permettre une contamination continue des abeilles au cours de l'hiver. Cette démarche a donc maintenu plus longuement le contact des abeilles avec l'imidaclopride que dans la pratique courante où les apiculteurs prélèvent également le miel de corps et le remplacent par du sirop de nourrissage.

Ce protocole aurait donc été à même d'entraîner la mort immédiate ou différée d'un grand nombre d'abeilles d'intérieur que l'on aurait alors trouvées devant les ruches au cours de la saison apicole et au cours de l'hiver. Une dépopulation hivernale aurait été pour le moins mesurable au début du printemps suivant.

*d/ Le protocole adopté était-il à même de mettre en évidence les conséquences d'une perturbation du comportement des butineuses ?*

Parmi les perturbations comportementales induites par l'imidaclopride, Kirchner (Kirchner 1999) décrit dans un court résumé que la danse oscillante de butineuses nourries avec du sirop contenant  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  d'imidaclopride est moins précise qu'en conditions normales, ce qui révèle chez celles-ci une perturbation des capacités d'orientation. Malheureusement aucun

protocole ne peut offrir à des colonies complètes un libre accès à des nourrisseurs distants des ruches, tout en l'interdisant à d'autres colonies témoins élevées au même endroit. Cependant, le sirop distribué aux abeilles était accessible aux butineuses. En effet, avant leur départ, celles-ci consomment du nectar ou du miel stockés dans la colonie pour assurer les dépenses énergétiques de leur vol (Doucet-Personeni *et al.* 2003). Ce besoin est évalué à 11.5 mg de sucres par heure de vol : une part de celui-ci étant assurée par le repas effectué avant l'envol, une autre part lors du butinage (Doucet-Personeni *et al.* 2003).

Ce protocole aurait donc été à même d'entraîner une disparition des butineuses après leur envol et bien que leurs cadavres n'eussent pas pu être retrouvés, leur disparition aurait du alors se traduire par une dépopulation mesurable dès l'été.

*e/ Le sirop de nourrissage a-t-il été utilisé par les ouvrières pour produire du miel ?*

On peut en effet se poser la question de savoir si la concentration en saccharose n'est pas significativement plus élevée que la concentration en sucre du nectar de tournesol par exemple et grèverait donc la représentativité du modèle expérimental testé. En fait, les nectars naturels ont une composition très variable, comprise entre 2,1 et 65% dépendant de l'espèce et de la variété végétale, des conditions auxquelles sont soumises les plantes nectarifères (température, humidité du sol, de l'air ...) (Grout 1946). Nous n'avons pas trouvé de données sur la composition du nectar de tournesol. On sait toutefois que "la plupart des plantes [nectarifères] produisent des nectar qui contiennent 40 à 50% de sucres et ces concentrations sont manifestement les plus attractives pour les abeilles" (Root 1990). Les abeilles ne consomment pas volontiers les nectars naturels dont la concentration en sucre est inférieur à 30% et recherchent les nectars à forte concentration en sucre : leur préférence est de 50% selon les expériences de Jamieson et Austin ((Jamieson & Austin 1956). Rappelons également que cette valeur de 50% que nous avons utilisée dans notre protocole correspond à la pratique apicole courante des nourrissage. Dans cette expérience, les abeilles ont "travaillé" le sirop chargé d'imidaclopride et l'ont réparti dans toute la ruche comme les titrages en retour de l'imidaclopride et de l'acide 6-chloronicotinique dans le miel et les abeilles en font foi.

#### **4.2.2. discussion sur la signification des résultats observés :**

A notre connaissance, ceci est le premier rapport d'une exposition répétée de colonies complètes d'abeilles à du sirop supplémenté à l'imidaclopride à des concentrations comparables à celles mesurées dans le nectar en plein champ. Puisque cet essai n'a pas permis de reproduire les troubles attribués à ce produit par de nombreux apiculteurs, plusieurs interprétations dont toutes ne sont pas exclusives peuvent être proposées :

*a) Les troubles décrits par les apiculteurs ont une autre cause que l'imidaclopride.*

Même si la toxicité de l'imidaclopride sur des abeilles isolées ou en petits groupes en dehors de leur colonie a été mise en évidence expérimentalement par de nombreux auteurs, la question est de savoir comment se traduit cette toxicité au niveau de la colonie complète. Tasei *et al.* (Tasei *et al.* 2000) ont montré que la sensibilité des ouvrières de *Bombus terrestris* à des doses sub-létales d'imidaclopride était très dépendante de leur âge. De même, l'existence de deux types de récepteurs nicotiques chez l'abeille qui auraient des affinités distinctes vis à vis de l'imidaclopride et seraient exprimés différemment selon que les individus sont âgés de 7 ou 8 jours a été suggérée (Guez *et al.* 2001). Les résultats obtenus en

laboratoire sur une population d'âge défini ne peuvent donc être transposés à une colonie complète. Le type de protocole adopté est donc irremplaçable car il intègre toutes les classes d'âge, la dynamique propre de la ruche et sa capacité de mettre en œuvre divers types de réponse à l'agression toxique. Dans cette expérience, les colonies nourries avec des doses sub-létales d'imidaclopride ont manifestement réagi à celles-ci notamment pendant la période de nourrissage, mais les effets observés ont été si faibles qu'il est douteux qu'ils auraient été observables dans une pratique apicole courante. L'effet létal significatif de l'imidaclopride sur le terrain ne peut évidemment être exclu sans études plus approfondies sur les troubles observés par les apiculteurs. Dans ce contexte, une synergie avec un ou plusieurs autres facteurs (toxiques, organismes pathogènes) qui auraient été fortuitement absents de notre environnement expérimental (peut-être présents dans le tournesol ou dans le pollen de tournesol) doit être envisagé. Ces éventuelles synergies restent à identifier et à démontrer.

*b/ La race d'abeille utilisée dans ce protocole peut être moins sensible à l'imidaclopride que les races qui dominent dans les régions de grandes cultures où les apiculteurs attribuent à ce produit la plupart des troubles observés.* On sait depuis de nombreuses années que les colonies d'abeilles varient grandement dans leur aptitude à mettre en œuvre les mécanismes de détoxification qui leur permettent de résister aux insecticides (Tahori *et al.* 1969, Smirle & Winston 1988). De plus, contrairement aux autres insecticides, l'imidaclopride a une toxicité hautement variable pour l'abeille : par voie orale, on cite des  $DL_{50}$  allant de 5.4 à 40.9 ng.abeille<sup>-1</sup> (Suchail *et al.* 2000), (Schmuck *et al.* 2001) et par contact, l'intervalle est de 6.7 à 230.3 ng.abeille<sup>-1</sup>. Bien entendu, de telles variations ont aussi pour origine des conditions expérimentales fort différentes, et parmi celles-ci le choix de la souche d' *A. mellifera* doit compter (Suchail *et al.* 2000).

*c) Les abeilles utilisées dans ce protocole étaient dans des conditions qui leur ont permis de résister aux doses d'imidaclopride qu'elles ont absorbées.* En plus de prédispositions génétiques, l'état de santé et les conditions physiologiques des abeilles sont des paramètres qui déterminent leur capacité de détoxification. En particulier, la quantité et la qualité du pollen ingéré aux premiers jours de la vie de l'abeille déterminent cette capacité jusqu'à sa mort (Wahl & Ulm 1983). Decourtye *et al.* (Decourtye *et al.* 2003) ont fait l'hypothèse que la plus grande sensibilité des abeilles d'hiver comparées aux abeilles d'été de la même colonie pouvait s'expliquer par le fait que seules les secondes ont accès à du pollen frais. Il a également été démontré que le pollen de tournesol contient trop peu de protéines pour assurer aux ouvrières un développement normal des glandes hypopharyngiennes (Pernal & Currie 2000). Les abeilles utilisées dans ce protocole disposaient de sources de nourriture certainement plus variées et plus régulièrement réparties au cours de l'année que des abeilles maintenues en région de grandes cultures. De plus ces dernières, subissant chaque année les effets des toxiques, pourraient voir leurs populations légèrement diminuer d'année en année jusqu'à ce que la colonie ne puisse plus compenser ces pertes cumulées.

Cette étude confirme s'il en était besoin, la complexité du problème posé et l'intérêt de poursuivre des études de terrain pour établir les mécanismes sous-jacents aux phénomènes sévères de dépérissements observés par les apiculteurs.

## **5. RESUME**

Deux groupes de huit colonies d'abeilles (*Apis mellifera mellifera*) de race locale noire ont été nourries pendant l'été avec du sirop de saccharose 50% contenant de l'imidaclopride à la concentration 0.5 ou 5  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (chaque colonie ayant reçu 13 fois 1 litre de sirop au cours d'une période de 34 jours). Ces colonies ont été suivies pendant cette période et jusqu'à la fin de l'hiver suivant en parallèle à d'autres colonies témoins non nourries ou nourries avec du sirop non supplémenté à l'imidaclopride. Les seules différences significatives observées ont été : - pendant la période de nourrissage, une plus grande activité des butineuses (nombre d'abeilles entrant dans la ruche et fréquence des apports de pollen) dans les colonies nourries avec du sirop supplémenté à l'imidaclopride comparées aux colonies témoin nourries, - un plus grand nombre de cellules de couvain operculé dans les colonies nourries avec du sirop supplémenté à l'imidaclopride. Après la période de nourrissage, l'activité est redevenue identique dans tous les groupes. La mortalité des abeilles a été très faible et d'un niveau comparable dans tous les groupes de colonies au cours de toute l'étude (les colonies ont été suivies jusqu'au premier jour du printemps suivant).

L'exposition répétée de ces colonies à du sirop supplémenté à l'imidaclopride à des concentrations comparables à celles mesurées dans le nectar en plein champ n'a donc provoqué ni mortalité immédiate ni mortalité différée (en particulier hivernale) alors que de telles mortalités sont rapportées par de nombreux apiculteurs qui les attribuent à l'usage de ce produit d'enrobage de semences.

Des recherches supplémentaires devraient donc être entreprises pour tester les hypothèses suivantes : - soit les troubles décrits par les apiculteurs ont une autre cause que l'imidaclopride, soit ces troubles sont bien imputables à ce produit, mais ils ne peuvent apparaître que lorsqu'une ou plusieurs des conditions suivantes sont satisfaites :

- colonies affaiblies par la par l'effet cumulé de plusieurs intoxications ou par la présence simultanée d'un ou plusieurs autres produits (qui restent à identifier) ou de pathogènes qui agiraient en synergie,
- absence de sources de nourriture riche et variée,
- utilisation de races d'abeilles n'ayant pas développé de résistance à l'imidaclopride.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Agresti A. 1990. Categorical data analysis. John Wiley & Sons, New York.
- Bortolotti, L., R. Montanari, J. Marcelino, P. Medrzycki, S. Maini, and C. Porrini. 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology* **56**:63-67.
- Cochran, W. G. 1954. Some methods for strengthening the common  $X^2$  tests. *Biometrics* **10**:417-454.
- Decourtye, A., E. Lacassie, and M. H. Pham-Delègue. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science* **59**:269-278.
- Doucet-Personeni C., Halm M.-P., Touffet F., Rortais A. & Arnold G. Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho<sup>®</sup>) et troubles des abeilles. Comité Scientifique et Technique des Troubles des Abeilles. 2003.
- Giauffret, A. 1974. Couvain sacciforme de l'abeille (Sacbrood). Pages 569-570 in F. Bricout, L. Joubert, and J. M. Huraux editors. *Diagnostic immunosérologique des viroses humaines et animales*. Maloine, Paris.
- Grout R. A. 1946. The hive and the honeybee. Dadant & Sons, Hamilton.
- Guez, D., S. Suchail, M. Gauthier, R. Maleszka, and L. P. Belzunces. 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* **76**:183-191.
- Hu, X. P., and R. J. Prokopy. 1998. Lethal and sublethal effects of imidacloprid on apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella* Walsh (dipt., tephritidae). *Journal of Applied Entomology* **122**:37-42.
- James, D. G., and T. S. Price. 2002. Fecundity in twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. *Journal of Economic Entomology* **95**:729-732.
- Jamieson, C. A., and G. H. Austin. 1958. Preference of honeybees for sugar solutions. *Proceedings of the 10th Int. Congr. Entomol.*, 1956 **4**:1059-1062. (cited by Moffett et al., 1975)
- Kaakeh, W., B. L. Reid, T. J. Bohnert, and G. W. Bennett. 1997. Toxicity of imidacloprid in the german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (imperfect Fungi: Hyphomycetes). *Journal of Economic Entomology* **90**:473-482.
- Kirchner, W. H. 1999. Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid (Gaucho<sup>®</sup>) on the behaviour of honeybees. Association of institutes for bee research, 50 year anniversary 1949-1999, reports of the 46th seminar in Marburg, 23-25 March 1998. *Apidologie* **30**:422-423.
- Koppenhöfer, A. M., and H. K. Kaya. 2000. Interactions of a nucleopolyhedrovirus with azadirachtin and imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**:84-86.
- Kramer, C. Y. 1956. Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics* **12**:309-310.
- Lehmann E. L. 1975. *Nonparametrics: statistical methods based on ranks*. Holden-Day, San Francisco.



- Morse, R. A. 1997. Honey bees and pesticides. Pages 550-555 in R. A. Morse, and K. Flottum editors. Honey bee pests, predators and diseases. The A.I. Root Company, Medina, Ohio, U.S.A.
- Nauen, R., K. Tiejn, K. Wagner, and A. Elbert. 1998. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Pesticide Science* **52**:23-57.
- OIE. 2000a. Acariosis of bees. Pages 778-783 in Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- OIE. 2000b. American foulbrood. Pages 784-788 in Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- OIE. 2000c. European foulbrood. Pages 789-792 in Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- OIE. 2000d. Nosemosis of bees. Pages 793-795 in Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris.
- Oomen, P. A., A. DeRuijter, and J. VanderSteen. 1992. Method for honeybee brood feeding tests with insect growth- regulating insecticides. *Bulletin OEPP/EPPO* **22**:617-624.
- Pernal, S. F., and R. W. Currie. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **31**:387-409.
- Quintela, E. D., and C. W. McCoy. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria Bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology* **26**:1173-1182.
- Ramakrishnan, R., D. R. Sutter, C. H. Nakatsu, and G. W. Bennett. 2000. Feeding inhibition and mortality in *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) after exposure to imidacloprid treated soils. *Journal of Economic Entomology* **93**:422-428.
- Ribière, M., J. P. Faucon, and M. P pin. 2000. Detection of chronic bee paralysis virus infection: application to a field survey. *Apidologie* **31**:567-577.
- Ribière, M., C. Triboulot, L. Mathieu, C. Auri res, J. P. Faucon, and M. P pin. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* **33**:339-351.
- Root A. I. 1990. *ABC and XYZ of bee culture.*, 40th Edition edition. The A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA.
- Schmuck, R., R. Sch ning, A. Stork, and O. Schramel. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science* **57**:225-238.
- Scott-Dupree C.D. & Spivak M. The impact of Gaucho® and TI-435 Seed-treated canola on honey bees, *Apis mellifera* L. Universit  de Guelf, Ontario Canada Universit  du Minnesota USA. 2000.
- Siegel S., and N. J. Castellan. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences.*, 2nd edition. McGraw-Hill, New York.
- Smirle, M. J., and M. L. Winston. 1988. Detoxifying enzyme activity in worker honey bees: an adaptation for foraging in contaminated ecosystems. *Canadian Journal of Zoology* **9**:1938-1942.
- Smirle, M. J., M. L. Winston, and K. L. Woodward. 1984. Development of a sensitive bioassay for evaluating sublethal pesticide effects on the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **77**:63-67.
- Stork A. Residues of 14C-NTN 33893 (imidacloprid) in blossoms of sunflower (*Helianthus Annus*) after seed dressing. Bayer AG, Crop Protection Development Institute for Metabolism Research and Residue Analysis Leverkusen. 1999.

- Suchail, S., D. Guez, and L. P. Belzunces. 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**:1901-1905.
- Tahori, A. S., Z. Sobel, and M. Soller. 1969. Variability in insecticide tolerance of eighteen honey bee colonies. *Entomol.Exp.Appl.* **12**:85-98.
- Tasei, J. N., J. Lerin, and G. Ripault. 2000. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest Management Science* **56**:784-788.
- Wahl, O., and K. Ulm. 1983. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia* **59**:106-128.

	Nourrissement	Activité	Mortalité	Pesage	Visite	Photographie du couvain op.	Traitements	Récolte du miel	prise d'échantillons pour recherches de résidus						
									cire	sirop	abeilles	miel	pollen		
29 mai 2000	Transfert des abeilles sur cire gaufrée						Apivar								
11 juillet 2000				✓	✓	✓			✓						
12 juillet 2000	✓	✓								✓	✓				
13 juillet 2000		✓	✓												
17 juillet 2000	✓	✓	✓												
19 juillet 2000	✓	✓	✓												
21 juillet 2000	✓	✓	✓	✓							✓				
24 juillet 2000	✓		✓		✓	✓									
26 juillet 2000	✓	✓	✓												
27 juillet 2000		✓	✓	✓											
28 juillet 2000	✓	✓	✓												
31 juillet 2000	✓	✓	✓												
2 août 2000	✓	✓	✓												
3 août 2000		✓	✓	✓											
4 août 2000	✓	✓	✓												
7 août 2000	✓		✓		✓	✓									
9 août 2000	✓	✓	✓												
10 août 2000		✓	✓	✓											
11 août 2000	✓														
14 août 2000		✓	✓												
16 août 2000		✓	✓	✓									✓		
17 août 2000			✓					✓						✓	
21 août 2000			✓		✓	✓									
22 août 2000							Apivar								
24 août 2000			✓	✓											
1 septembre 2000		✓	✓	✓											
4 septembre 2000					✓	✓									
7 septembre 2000		✓		✓											
13 septembre 2000				✓											
21 septembre 2000				✓											
2 octobre 2000		✓		✓											
20 octobre 2000		✓		✓											
25 octobre 2000					✓	✓					✓				
26 octobre 2000		✓		✓											
6 novembre 2000							Apivar								
7 novembre 2000							Périsin								
18 décembre 2000		✓													
20 décembre 2000				✓											
3 janvier 2001							Fumidil B								
9 janvier 2001							Fumidil B								
12 janvier 2001				✓											
22 janvier 2001							Fumidil B								
1 février 2001				✓											
16 février 2001				✓											
21 mars 2001					✓										

Tableau 1. Principales étapes du protocole.

Organochlorés (0.001 à 0.01 mg.kg <sup>-1</sup> )	Organophosphorés (0.01 à 0.3 mg.kg <sup>-1</sup> )	Pyrethriinoïdes de synthèse (0.005 mg.kg <sup>-1</sup> )	Autres (0.05 à 0.1 mg.kg <sup>-1</sup> )
dieldrine	azinphos-éthyl	cyperméthrine	bromopropylate
α-endosulfan	azinphos-méthyl	cyfluthrine	dicofol
β-endosulfan	chlorpyrifos-éthyl	deltaméthrine	captafol
γ-HCH	diazinon	fenvallérate	captan
heptachlore	diéthion ou éthion	fluvalinate	folpet
	disulfoton	lambda-cyhalothrine	methoxychlor
	fénitrothion	perméthrine	sulfure
	fenthion		tetradifon
	fonofos		thionazin
	malathion		
	méthidathion		
	parathion-éthyl		
	parathion-méthyl		
	phosalone		

Tableau 2. Pesticides recherchés par la méthode multirésidus. Les limites de détection sont indiquées entre parenthèses.

date (délai en jours)	11 juillet 00 (0)	24 juillet 00 (13)	7 août. 00 (27)	21 août. 00 (41)	4 sept. 00 (55)	25 oct. 00 (106)	21 mars 01 (253)
Gno	9,5	9,6	10,1	10,0	8,5	8,9	8,8
G0	9,8	10,6	11,3	10,3	9,6	9,7	8,5
G0.5	10,4	11,0	12,9	11,0	10,6	9,8	10,5
G5	9,8	11,3	13,1	10,6	9,8	9,5	8,0
degré de significativité de la différence entre groupes de la variation du nombre d'inter- cadres occupés (cette variation est mesurée à partir du 11 juillet 2000)							
entre tous les groupes (test de Kruskal-Wallis)		0.15	0.23	0.88	0.49	0.87	0.62
entre groupes nourris (test de Jonckheere-Treppstra)		0.22	0.09	0.46	0.44	0.35	0.29

Tableau 3. Nombre moyen d'inter-cadres occupés par les abeilles adultes dans les colonies des groupes Gno, G0, G0.5 et G5. Seuil de significativité des tests statistiques mis en œuvre pour l'étude de la variation de ce nombre depuis le début de l'expérimentation.  
(Il n'apparaît entre groupes, aucune différence statistiquement significative).

		diagnostic du 25 octobre 2000							
		Gno		G0		G0.5		G5	
		Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
diagnostic du 11 juillet 2000	Neg	0	0	0	5	1	3	2	1
	Pos	1	7	0	4	1	3	2	3

Tableau 4. Resultat de la mise en évidence du génome du virus de la paralysie chronique de l'abeille par RT-PCR (nombre de colonies dans les groupes Gno, G0, G0.5 et G5)



Gno	Sirop (du premier nourrissage)				Abeilles		Miel		
	Imidaclopride		acide 6-chloronicotinique		Imidaclopride	acide 6-chloronicotinique	Imidaclopride	acide 6-chloronicotinique	
	AFSSA-MA	GIRPA	AFSSA-MA	GIRPA	AFSSA-MA	GIRPA	AFSSA-MA	GIRPA	
G0	sans objet	sans objet	sans objet	non fait *	non fait *	< LD	< LD	< LD	< LD
G0.5	< LD	< LD	< LD	non fait	non fait	< LD	< LD	< LD	< LD
G5	non fait	< LD	< LD	traces	traces	< LD	< LD	< LD	< LD
	juste après préparation : 4,65 mg.l <sup>-1</sup> après 24 h, à temp. ambiante : non fait	traces traces	traces traces	< LD	< LD	2,95 µg.kg <sup>-1</sup>	traces	traces	traces

Tableau 5. Tirage de l'imidaclopride dans le sirop donné aux abeilles des colonies des groupes G0, G0.5 et G5, dans les abeilles mortes et dans le miel récolté dans tous les groupes.

\* Des abeilles témoins ont été utilisées dans cette série, mais elles n'étaient pas originaires des ruches du groupe Gno. Le titre trouvé a été dans les deux cas inférieurs à la LD.

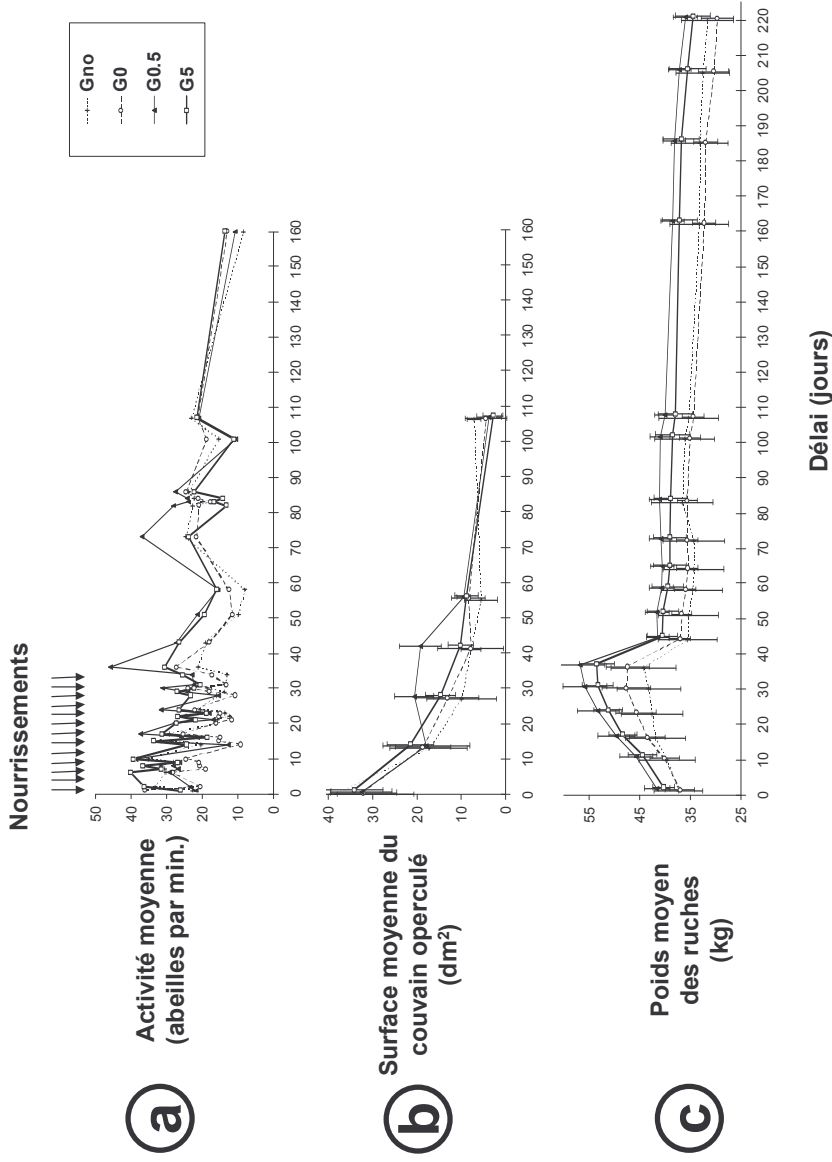


Figure 1. Activité, surface du couvain operculé et poids des ruches : moyennes pour les groupes expérimentaux Gno, G0, G0.5 et G5 pendant et après la période de nourrissage.

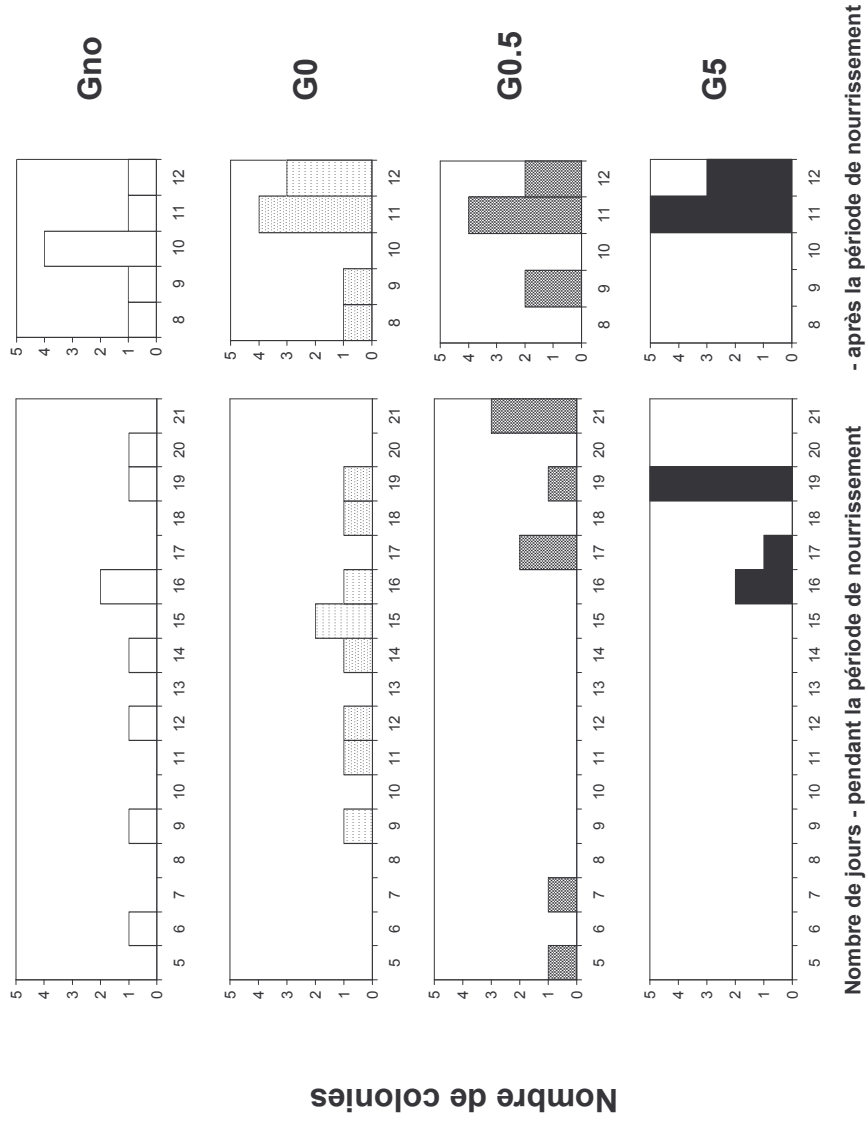


Figure 2. Nombre de jours au cours desquels des abeilles ont été vues ramenant du pollen à la ruche. Les abeilles ont été observées pendant 21 jours au cours de la période de nourrissage, et pendant 12 jours après cette période.

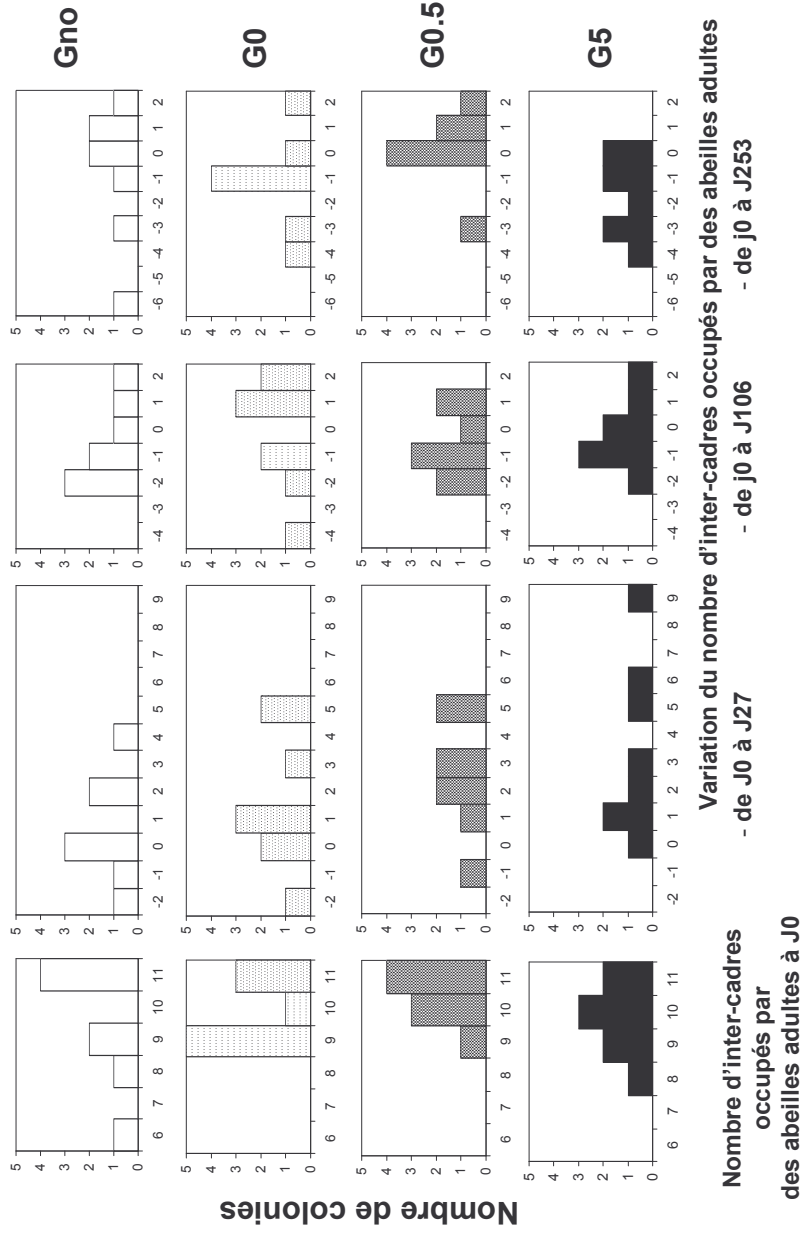
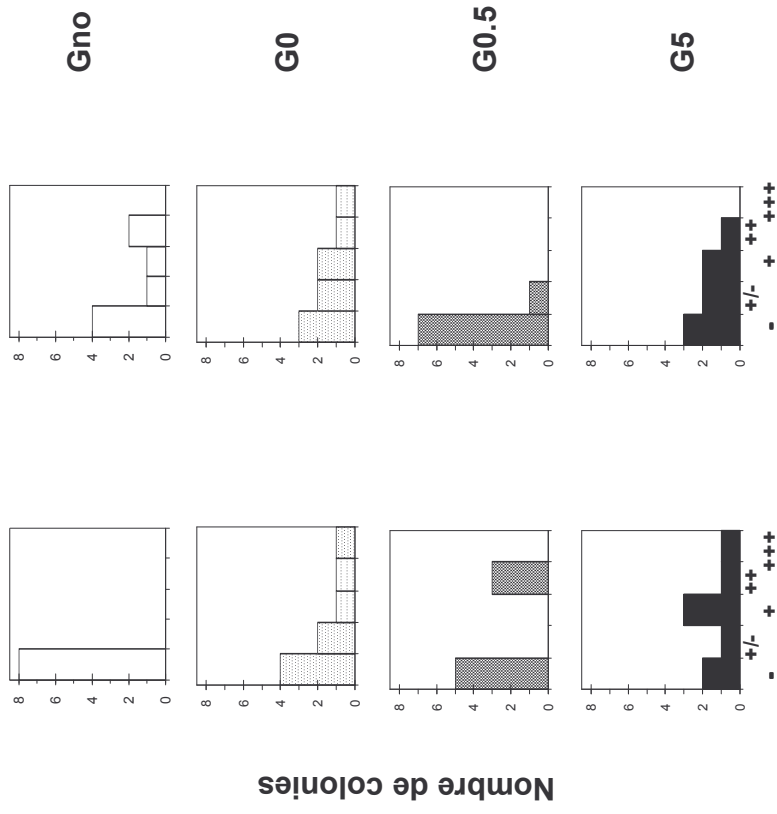


Figure 3. Distribution du nombre de colonies en fonction du nombre d'inter-cadres occupés par des abeilles adultes dans les groupes expérimentaux Gno, G0, G0.5 et G5.



**- avant la période de nourrissage      - après la période de nourrissage**  
 Figure 4. Distribution du nombre de colonies en fonction de leur niveau d'infestation par *Nosema apis* dans les groupes expérimentaux Gno, G0, G0.5 et G5.

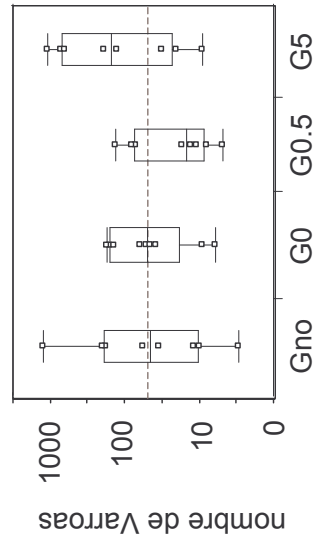


Figure 5. Nombre de varroas récoltés dans les colonies des groupes expérimentaux Gno, G0, G0.5 et G5. Les segments limitants les lignes verticales représentent les valeurs extrêmes, les boîtes verticales délimitent les quantiles 25 et 75%, et le segment horizontal médian indique la médiane.